HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---|---|
| Title | GALA修飾ナノ粒子の肺血管内皮標的化メカニズム解明と核酸創剤への応用展開 |
| Author(s) | 楠本, 憲司 |
| Degree Grantor | 北海道大学 |
| Degree Name | 博士(薬科学) |
| Dissertation Number | 乙第6952号 |
| Issue Date | 2015-03-25 |
| DOI | https://doi.org/10.14943/doctoral.r6952 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/59263 |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | Kenji_Kusumoto.pdf |

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博士学位論文

# GALA 修飾ナノ粒子の肺血管内皮標的化メカニズム解明と核酸創剤への応用展開

楠本　憲司

北海道大学大学院生命科学院

2015 年 3 月

# 目次

**略語表** ..... **1**
**序章** ..... **4**
**第 1 章. GALA-Liposome の肺血管内皮標的メカニズムの解明** ..... **12**
1.1 緒言 ..... 12
1.2 GALA 修飾リポソームの体内動態評価 ..... 15
1.3 IVRTCLSM を用いたマウス耳介皮膚静脈内における GALA-LPs の挙動観察 ..... 17
1.4 GALA-LPs のターゲット分子同定 ..... 18
1.5 GALA と異なるエンドソーム脱出素子（INF7）の肺移行性評価 ..... 21
1.6 まとめ ..... 21
**第 2 章. GALA/MEND を用いた siRNA による肺疾患治療応用** ..... **26**
2.1 緒言 ..... 26
2.2 核酸送達に及ぼす PEG 脂質誘導体の影響 ..... 27
2.3 siRNA 封入 GALA/MEND の調製 ..... 30
2.4 siRNA 封入 GALA/MEND の *in vivo* 肺血管内皮細胞ノックダウン評価 ..... 31
2.5 PEG 脂質が GALA/MEND の保存安定性及びノックダウンに及ぼす影響 ..... 32
2.6 GALA 修飾量の最適化 ..... 34
2.7 MEND の安全性評価 ..... 35
2.8 IVRTCLSM を用いた MEND の生体内挙動評価 ..... 37
2.9 siCD31 siRNA 封入 GALA/MEND 投与による肺転移モデルマウスの治療 ..... 41
2.10 まとめ ..... 43
**第 3 章. siRNA 封入 GALA/MEND 調製におけるエタノール希釈法の有用性評価** ..... **46**
3.1 緒言 ..... 46
3.2 エタノール希釈法による GALA/MEND の調製 ..... 48
3.3 エタノール希釈法により調製した GALA/MEND の機能評価 ..... 49
3.4 調製法が体内動態に及ぼす影響評価 ..... 51
3.5 調製法が細胞内動態に及ぼす影響評価 ..... 52
3.6 まとめ ..... 53
**第 4 章. PEG 脂質のアンカー構造が pDNA 封入 MEND の細胞内動態に及ぼす影響（Appendix）** ..... **56**
4.1 緒言 ..... 56
4.2 MEND の調製 ..... 57
4.3 PEG 脂質及び STR-INF7 修飾 MEND の細胞内動態評価 ..... 58
4.4 PEG 脂質修飾 MEND の細胞内動態評価 ..... 60

4.5 まとめ ..... 61
**総括 ..... 64**
**5. 実験方法 ..... 66**
5.1 試薬・材料・細胞・動物 ..... 66
5.2 機器 ..... 68
5.3 試薬調製 ..... 69
5.4 一般的操作 ..... 70
5.5 第 1 章の実験 ..... 71
5.6 第 2 章の実験 ..... 74
5.7 第 3 章の実験 ..... 77
5.8 第 4 章の実験 ..... 79
**謝辞 ..... 80**
**参考文献 ..... 82**

# 略語表

本論文では以下の略語を用いた。

| | |
|---|---|
| ALT | alanine transaminase |
| AST | aspartate transaminase |
| BCA | bicinchoninic acid |
| C.V. | coefficience variation |
| C16Cera-mPEG | N-palmitoyl-sphingosine-1-{succinyl [methoxy (polyethylene glycol) 2000]} |
| C8Cera-mPEG | N-octanoyl-sphingosine-1-{succinyl [methoxy (polyethylene glycol) 2000]} |
| CD31 | cluster of differentiation 31 |
| CD34 | cluster of differentiation 34 |
| cDNA | complementary DNA |
| CHE | cholesteryl hexadecyl ether |
| Chol | cholesterol |
| Chol-mPEG | cholesteryl- mPEG2000 |
| CLSM | confocal laser scanning microscopy |
| DDS | drug delivery system |
| DDW | deionized distilled water |
| DLS | dynamic light scattering |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle medium |
| DNA | deoxyribonucleic acid |
| DOPE | 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine |
| DOTAP | 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane |
| DOTMA | N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N -trimethylammonium chloride |
| DSPE-mPEG | 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phospho-ethanolamine-N-[methoxy-(polyethylene glycol)-2000] |
| EDTA | ethylenediamine N',N',N',N'-tetraacetic acid |
| EPC | egg phosphatidylcholine |
| EtOH | ethanol |
| FACS | fluorescence activated cell sorting |
| FBS | fetal bovine serum |
| G | gravity |
| GL | gaussia luciferase |
| HA2 | hemagglutinin 2 |
| HB | HEPES buffer |
| HBG | HEPES buffer-5% Glucose |
| HEPES | N-2-hydroxyethylpyperazine-N'-2-ethanesulfonic acid |

| | |
|---|---|
| HMVEC-L | Human Lung Microvascular Endothelial Cells |
| HPLC | high-performance liquid chromatography |
| Hr | hour |
| Hyd | hydration |
| ICR | institute of cancer research |
| ID | injection dose |
| IU | internanionol unit |
| IVRTCLSM | Intravital |
| LB | Luria-Bertani's broth |
| Luc | luciferase |
| MAM | Maackia amurensis Agglutinin |
| MEND | Multifunctional Envelop-type Nano Device |
| MFLM | mouse fetal lung mesenchyme |
| Min | minute |
| mRNA | messenger RNA |
| MW | molecular weight |
| NBD-DOPE | N-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)dioleoylphosphatidyl-ethanolamine |
| PBS | phosphate-buffered saline |
| PDI | polydispersity index |
| pDNA | plasmid deoxyribonucleic acid |
| PEG | polyethylene glycol |
| PEI | polyethylenimine |
| QD | quantum dot |
| qRT-PCR | quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction |
| Rho-DOPE | N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) dioleoylphosphatidyl-ethanolamine |
| RLU | relative light unit |
| RNA | ribonucleic acid |
| ROI | region of interest |
| Rpm | round per minute |
| SAα2,3Gal | sialic acidα2,3-galactose |
| SAα2,6Gal | sialic acidα2,6-galactose |
| sec | second |
| siRNA | small interference RNA |
| SSA | Sambucus sieboldiana Agglutinin |
| STR-INF7 | stearylated INF7 |
| STR-mPEG | stearyl-polyethylene glycol 2000 |
| Tris | tris (hydroxymethyl) aminomethane |

# 序章

## 序章

肺は外気から生体組織に必要な酸素を生体内に取り込み，不要な二酸化炭素を体外へ排出する呼吸を司り，生命維持に必要不可欠な臓器である．呼吸は，換気，拡散，血流（肺循環）の 3 つの過程がそれぞれ正しく機能することで正常なガス交換が可能となる．肺胞内酸素と生体内で産生された二酸化炭素が圧較差によりガス交換される肺胞-肺毛細血管間は，肺胞上皮細胞，間質，基底膜，毛細血管内皮細胞で構成され，その厚さは 0.3 μm，総面積は 50～100 $m^2$ に達する [1]．また，肺血管内皮細胞は，アンジオテンシン I，エイコサノイド，セロトニン，ノルエピネフリンなど血管作動性物質の代謝に関わっており，その表面積は 120 $m^2$ に達する [2]．

このように呼吸を司る肺は直接外気と接していることからガス・粉塵や感染による暴露を受けやすく，また全ての血液が経由するなど特殊な臓器であるため，多様な疾患が生じる．我が国における死因別順位は，悪性新生物，心疾患に続き肺炎が第 3 位であり，慢性閉塞性肺疾患（COPD）は第 9 位と，呼吸器疾患は上位 10 疾患の中に 2 疾患入っている（2013 年）[3]．さらに，悪性新生物において，肺がん死亡数は増加の一途を辿っており（図 1），我が国において第 1 位（7.3 万人（2013 年）），罹患者数も第 3 位（10.7 万人（2010 年））となっている [4]．世界においても同様の傾向にあり，肺がん死亡者数及び罹患者数は共に第 1 位となっている（図 2）[5]．さらに，COPD も，我が国だけでなく世界で罹患者数及び死亡数が増加することが予測されている [6]．その他にも，急性肺障害（ALI）/急性呼吸促迫症候群（ARDS），特発性肺線維症（IPF），肺高血圧症（PAH）など予後不良な疾患が多い．このように肺は多くのアンメットメディカルニーズを抱える臓器である．

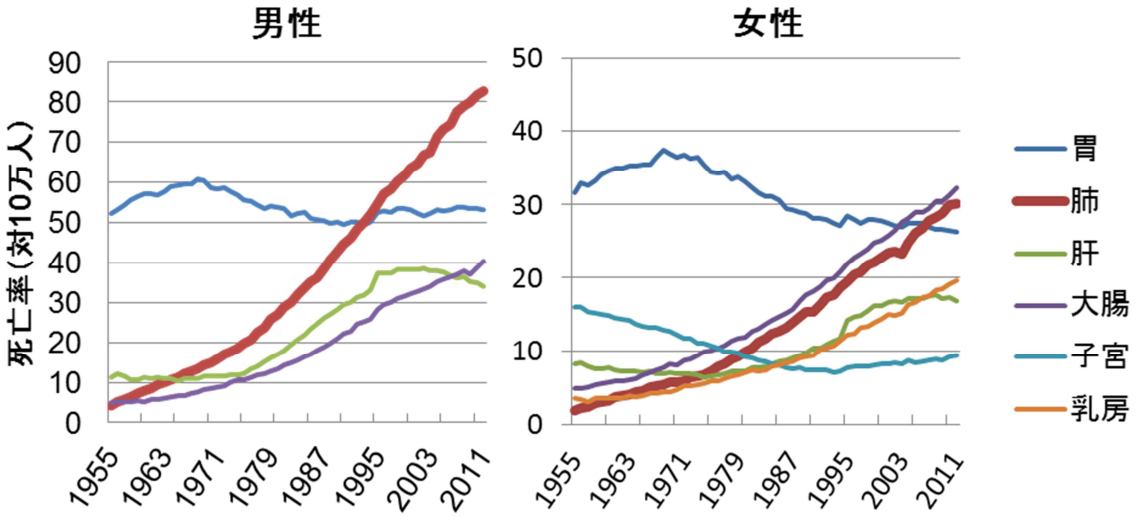



図 1　日本における悪性新生物の主な部位別死亡率（人口 10 万人対）の年次推移（2011）

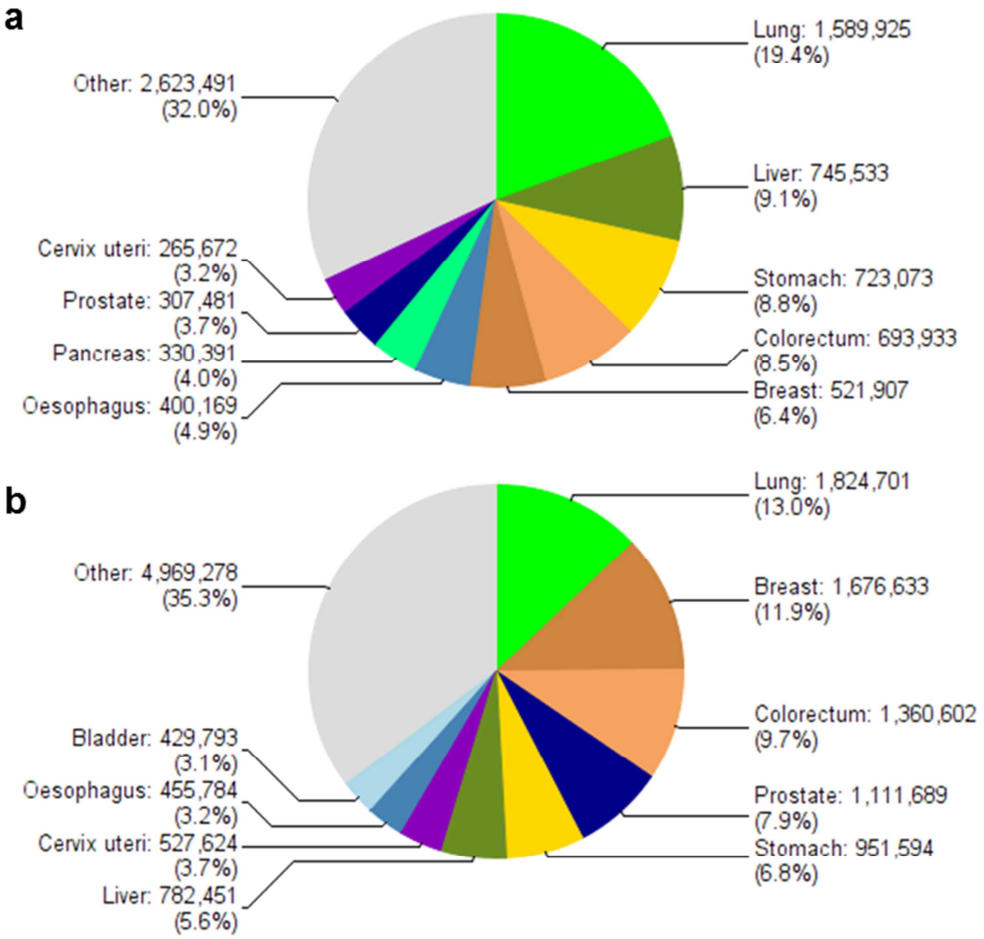



**図 2　世界における悪性新生物の部位別死亡者数（a）及び罹患者数（b）（2012 年）**

上述した肺疾患の中で，肺血管内皮細胞障害は，がん[7]，ALI/ARDS[8]，PAH[8, 9]と密接に関係することが報告されている．しかしながら，既存の医薬品では十分な治療がなされていないのが現状である．一方，近年めざましい進歩を遂げている，網羅的遺伝子解析，分子生物学的手法及びその機能解析により，これら疾患の原因遺伝子解明が急速に進められている．原因遺伝子の解明とともに，遺伝子発現を直接制御可能な核酸医薬（アンチセンス，small interference RNA（siRNA），リボザイム，micro RNA（miRNA），デコイ核酸（表 1））がアンメットメディカルニーズを満たす新たな治療薬として期待されている． アンチセンスは，1980 年代より研究がなされ，1998 年には Vitravene®（Fomivirsen，AIDS 患者のサイトメガロウイルス性網膜炎治療薬，硝子体内投与，ISIS 社）[10]が世界初の核酸医薬として米国で承認され（需要の減少に伴い現在は発売中止），2013 年には Kynamro®（Mipomersen sodium，ホモ型家族性高コレステロール血症，皮下投与，ISIS 社）[11]が初の全身投与型核酸医薬として米国で承認され，核酸医薬をリードしている．

一方で，siRNA は，2001 年に哺乳類細胞において RNA interference（RNAi）を誘起することが Tushl らにより報告され[12]，これを機に核酸医薬候補として注目を集め，世界中で研究が進め

られている．siRNA は，RISC（RNA-induced Silencing Complex）と複合体を形成し，この RISC と共に再利用されながら標的 mRNA を酵素的に分解するため，少量の siRNA が細胞質内に導入されることで効果を継続的に発揮する [13]．そのため，siRNA は，1 分子の mRNA にしか作用できないアンチセンスと比較して，ノックダウン効率が十数倍から百倍以上高いと言われ，アンチセンスに続く核酸医薬として応用研究が盛んに行われ，臨床試験も実施されている [14]．しかしながら，siRNA は，負電荷を持つ親水性高分子であるため細胞膜透過が困難であること，静脈内投与時に血中ヌクレアーゼにより分解されること，腎排泄により速やかに消失することから，局所投与による治療が可能な疾患を対象とした臨床試験が先行してきた．siRNA が低分子，抗体に代わる医薬品としての地位を築くためには，siRNA の全身投与を実現するデリバリー技術が不可欠となる．

**表 1　遺伝子発現を抑制する核酸医薬**

| 分類 | 特徴 | 開発企業 |
|---|---|---|
| アンチセンス | 標的遺伝子の mRNA に結合し，スプライシングを阻害するか，RNA の分解を促進することにより遺伝子の機能を抑制する．その構造は，1 本鎖 DNA あるいは 1 本鎖 RNA である． | Isis，Santaris，Prosensa，Sarepta |
| siRNA | siRNA は細胞内で RISC（RNA-induced Silencing Complex）と複合体を形成し，配列に相補的な mRNA を分解し，標的 mRNA の機能を抑制する 2 本鎖 RNA である． | Alnylam，Quark，Arrowhead |
| リボザイム | 核酸を切断する酵素活性を有する 1 本鎖 RNA で，mRNA を切断することにより遺伝子発現を抑制する． | Janssen-cilag |
| miRNA | miRNA は non-coading RNA の 1 種であり，標的 mRNA の翻訳抑制を行い，遺伝子発現の微調整を担う約 22 塩基の 2 本鎖 RNA である． | MiRagen，Mirna |
| デコイ核酸 | 転写因子結合部位と同一の配列を持つ 20 塩基程度の 2 本鎖 DNA で，細胞の核内で内在性転写因子と結合し，目的遺伝子発現を抑制する． | Anges-MG，Adynxx |

これまでに，治療薬としての siRNA 開発は癌組織 [15-18] や肝臓 [19-21] を標的とした報告が数多くなされており，臨床試験が実施されている薬剤も 10 種類を越えている [14, 22]．その理由として，癌組織や肝臓はいずれも特殊な血管構造を持つことが挙げられる．癌組織では，血管新生が亢進されており，血管内皮細胞間に間隙が多く存在するため，100 nm 程度の粒子は受動的に癌組織に集積することができる [23]．また，肝臓では，肝類洞血管内皮細胞に存在するフェネストラと呼ばれる 100 nm 程度の小孔が存在するため，ナノ粒子が受動的に集積する [24]．一方で，肺をはじめとした連続性毛細血管を持つ臓器は受動的な集積が期待できないため，血管内皮細胞標的化が

可能なリガンドを用いた能動的なデリバリーシステムが必要となる[25]．さらに siRNA を機能させるためには細胞内動態の制御が不可欠である．通常，ナノキャリアは標的組織到達後，エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ，ナノキャリアを内包したエンドソームはリソソームと融合し，分解系へと運ばれる．そのため，リソソームと融合する前にエンドソームから細胞質に siRNA を放出し，RISC と複合体を形成させる必要がある[26]．エンドソームは初期エンドソームから後期エンドソームに成熟する過程を経るが，RISC は後期エンドソームに集まることが報告されており[27,28]，siRNA がエンドソームから脱出するタイミングもその効果に影響を及ぼすことが推察される．このように，静脈内投与による肺血管内皮細胞ターゲットは，体内動態及び細胞内動態すべてを制御することが成功の鍵となる．

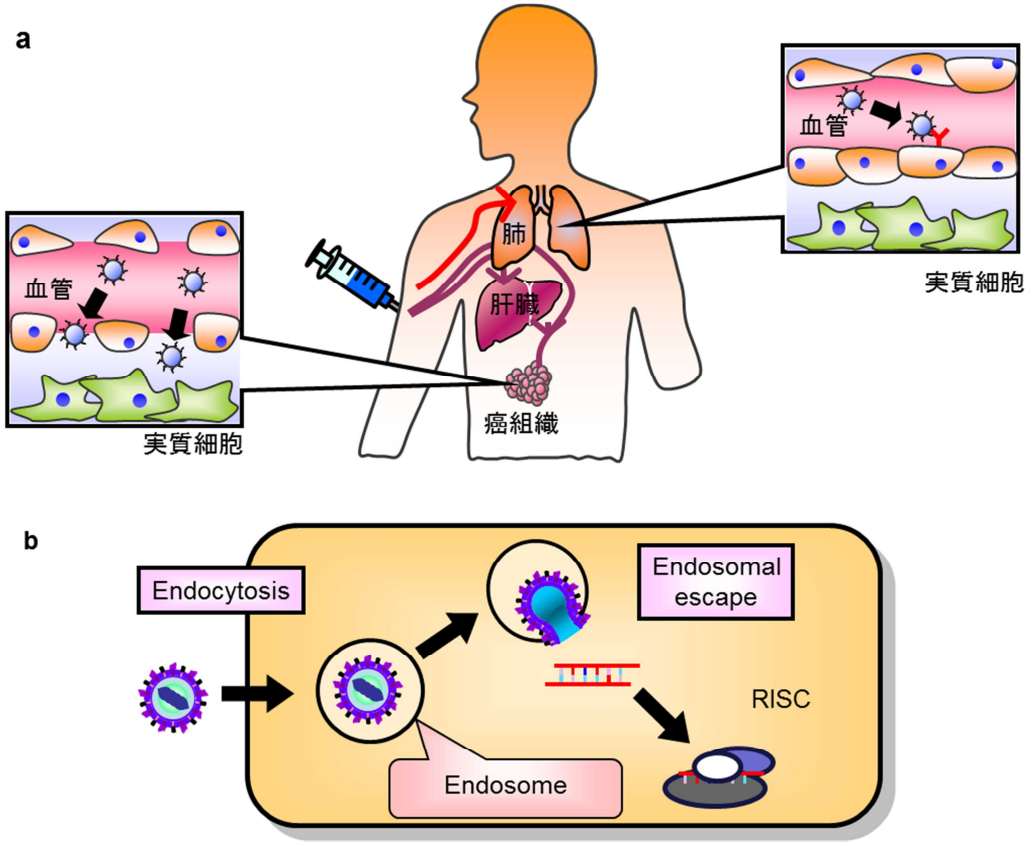



図 3　siRNA 送達キャリアの体内動態（a）及び細胞内動態（b）

（a）癌組織や肝臓は特殊な血管構造ゆえに，ナノ粒子が血管外に漏れやすいため，受動的なデリバリーが可能である．一方で，肺をはじめとした連続性毛細血管を持つ臓器は受動的な集積が期待できないため，血管内皮細胞標的化が可能なリガンドを用いた能動的なデリバリーシステムが必要となる．（b）ナノキャリアは標的組織到達後，エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ，エンドソームから細胞質に siRNA を放出し，RISC と複合体を形成する過程を経て，siRNA を機能させることができる．

上述した体内動態，細胞内動態制御といった siRNA 送達の課題を克服するキャリアとして，北海道大学　原島研究室では，多機能性エンベロープ型ナノ構造体（Multifunctional Envelop-type

Nano Device；MEND）の開発を行っている（図 4）[29,30]．MEND は核酸とポリカチオンから成るコア凝集体を脂質膜で覆う構造を取っており，エンベロープ型ウイルスであるインフルエンザウイルスを模倣したデザインとなっている．さらに，この脂質膜を介して標的化リガンド，ポリエチレングリコール（PEG），膜融合性ペプチドなどの機能性素子をそのトポロジーや密度を考慮して表面修飾することを可能にしている [31-33]．

一方，インフルエンザウイルスはエンベロープとエンドソーム/リソソーム膜の融合により自身の RNA ゲノムを細胞質へと送達している．この過程において，ウイルスの脂質膜上に提示されている Hemagglutinin 2（HA2）は酸性環境下に応答して構造を変化させることによって膜融合能を発揮する重要な役割を担っている [34,35]．そこで，Szoka らは，HA2 の機能を模倣して，エンドソーム破壊ペプチドとして GALA（WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAA）ペプチドを創製した [36]．GALA はエンドソーム内における酸性 pH にさらされることで α ヘリックス構造をとる．この GALA をコレステロール誘導体化し，MEND に修飾することで，細胞内動態が大きく改善することが明らかとなっている [33,37]．このように GALA は，細胞内動態の改善を目的として用いてきたが，新たな機能として肺移行性機能を備えている可能性が大鵬薬品工業(株)と原島研究室との共同研究により見出され，当研究室の石塚が博士論文により報告している [38]．しかしながら，GALA の肺移行性機能を示すデータは現象のみに留まっており，その詳細は不明であった．

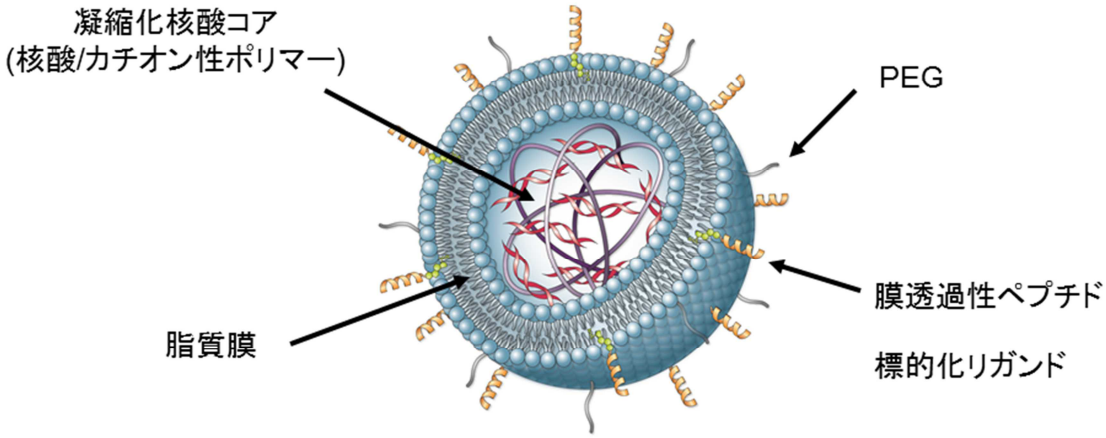



**図 4　多機能性エンベロープ型ナノ構造体（MEND）**

そこで，本研究は，GALA が持つ肺血管内皮標的化メカニズムの解明及び核酸創剤への応用展開を目的として，肺血管内皮細胞内に siRNA を送達する人工キャリアの開発を進めた．第 1 章では，GALA の肺血管内皮標的メカニズムを解明するため，GALA 修飾リポソームを用いて，その体内挙動及び GALA の標的分子同定を行った．第 2 章では，核酸創剤としての応用展開を図るために，siRNA を封入した GALA 修飾 MEND（GALA/MEND）による肺ノックダウン効果及び肺

転移癌モデルマウスの治療効果を評価した．さらに，リアルタイム生体内共焦点レーザー顕微鏡を用いて生きたマウスの肺毛細血管を観察することで, GALA/MEND が血管内を流れる様を直接可視化した．第 3 章では，GALA/MEND の工業化の可能性を見出すため，エタノール希釈法による GALA/MEND の調製を試みた．第 4 章では，GALA を用いた研究ではないものの，MEND を構成する成分として重要な PEG 脂質誘導体がその細胞内動態に及ぼす影響について，pDNA 封入 MEND を用いて評価した研究を本論文の Appendix として収載した．

# 第１章

# GALA-Liposome の
# 肺血管内皮標的メカニズムの解明

# 第1章. GALA-Liposome の肺血管内皮標的メカニズムの解明

## 1.1　緒言

核酸送達に必須である細胞内動態制御機能を MEND に付与するため，原島研究室では GALA ペプチドを用いてきた．GALA は 1987 年に Szoka らにより，インフルエンザウイルスのヘマグルチニン（HA2）の機能を模倣して創製され，グルタミン酸（E）・アラニン（A）・ロイシン（L）・アラニン（A）の繰り返し配列を基本とした 30 個のアミノ酸残基からなるオリゴペプチドである（WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAA）[36]．GALA は，中性条件下では，グルタミン酸が負に帯電することで，立体的な反発を生みランダムコイル構造をとるが，酸性条件下では，グルタミン酸がプロトン化された結果，立体的な反発がなくなり，脂質膜と親和性が高い α-ヘリックス構造へと変化することが知られている（図 1.1-1）．この GALA を MEND の脂質二重膜に固定し，脂質膜の表面上に自発的に提示させるため，当研究室では，GALA をコレステロール誘導体化することにより，MEND に修飾している [33]．標的とする細胞内に取り込まれた核酸が機能を発揮するためには，核酸のエンドソーム脱出が律速となるが，MEND に修飾された GALA はエンドソーム内の酸性条件下において，エンドソーム膜と MEND の脂質膜との膜融合を誘引し，内封物である核酸の細胞質内への送達効率改善をもたらすことが報告されている [30, 33, 39]．

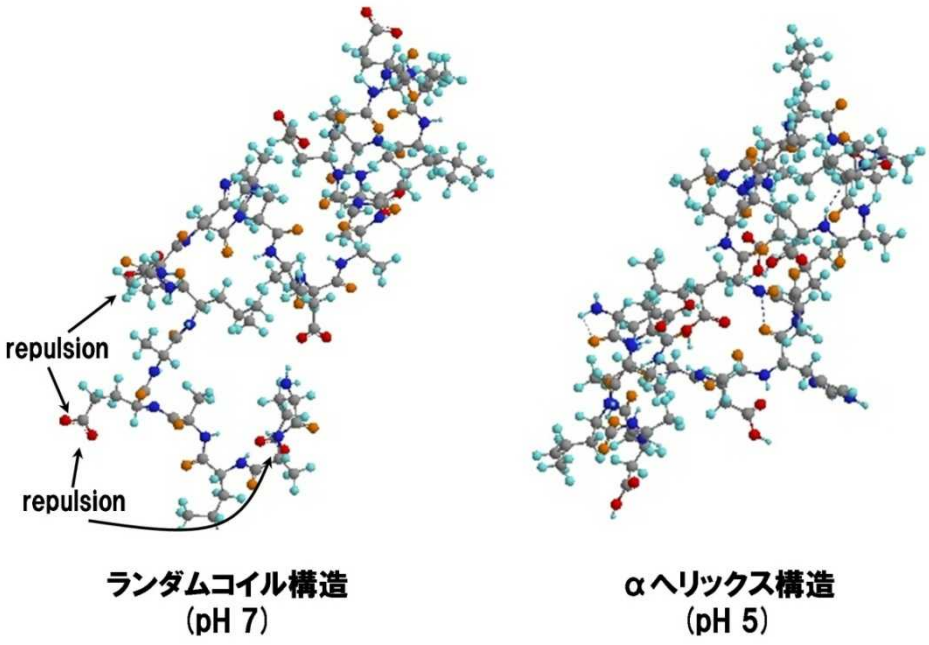



図 1.1-1　GALA の立体構造（ランダムコイル構造（pH 7）と α ヘリックス構造（pH 5））

中性条件下（pH 7）ではグルタミン酸の電気的反発によりランダムコイル構造をとり，酸性条件下（pH 5）では電気的反発が解消されることにより α ヘリックス構造をとる．

図は，石塚，北海道大学大学院生命科学院，博士学位論文より抜粋した．

当研究室は，このような GALA の特徴を利用し，pH 応答性エンドソーム脱出素子として使用してきたが，GALA が別に新しい機能を持つことを大鵬薬品工業(株)との共同研究により見出し，当研究室の石塚が博士論文により報告している [38]．石塚は，肺血管内皮標的型遺伝子デリバリーシステムを構築するため, IRQRRRR の 7 アミノ酸残基からなる IRQ ペプチド [40] をリガンドとして用い, 細胞内動態改善素子である Chol-GALA と共に修飾したキャリアの開発を試みていた [41]．このシステムを最適化する過程で，GALA 自身が肺血管内皮細胞の標的リガンドとしての機能を別に備えていることが発見された．その経緯を 図 1.1-2 に示した．まず，IRQ のスペーサーとして distearyl 誘導体化した PEG2000 を用いてリポソーム表面に修飾した時, IRQ 修飾リポソームは未修飾時と比較して，約 20 倍高い集積を示した．次に，遺伝子導入を目的として MEND を構築した．このキャリアは，細胞内動態改善を目的として GALA を修飾しており，ここにスペーサーとして monostearyl 誘導体化した PEG900 を MEND 表面に修飾していた．この MEND において，IRQ 修飾による肺集積改善効果はわずかに 1.3 倍であった．しかしながら，IRQ 未修飾 MEND においても高い肺集積が見られており, IRQ に代わり肺移行性を示す素子の存在が示唆された．そこで，GALA を外した IRQ 修飾 MEND の肺集積性を評価した結果，著しく低下したことから，GALA が肺移行性素子として機能している可能性が示唆された．このように石塚は，新しい機能として肺移行性も併せ持つ可能性を示したが，そのメカニズムに関する詳細は十分に検討されていなかった．そこで，本章では，GALA が持つ肺移行性メカニズムを解明することを目的として研究を進めた．

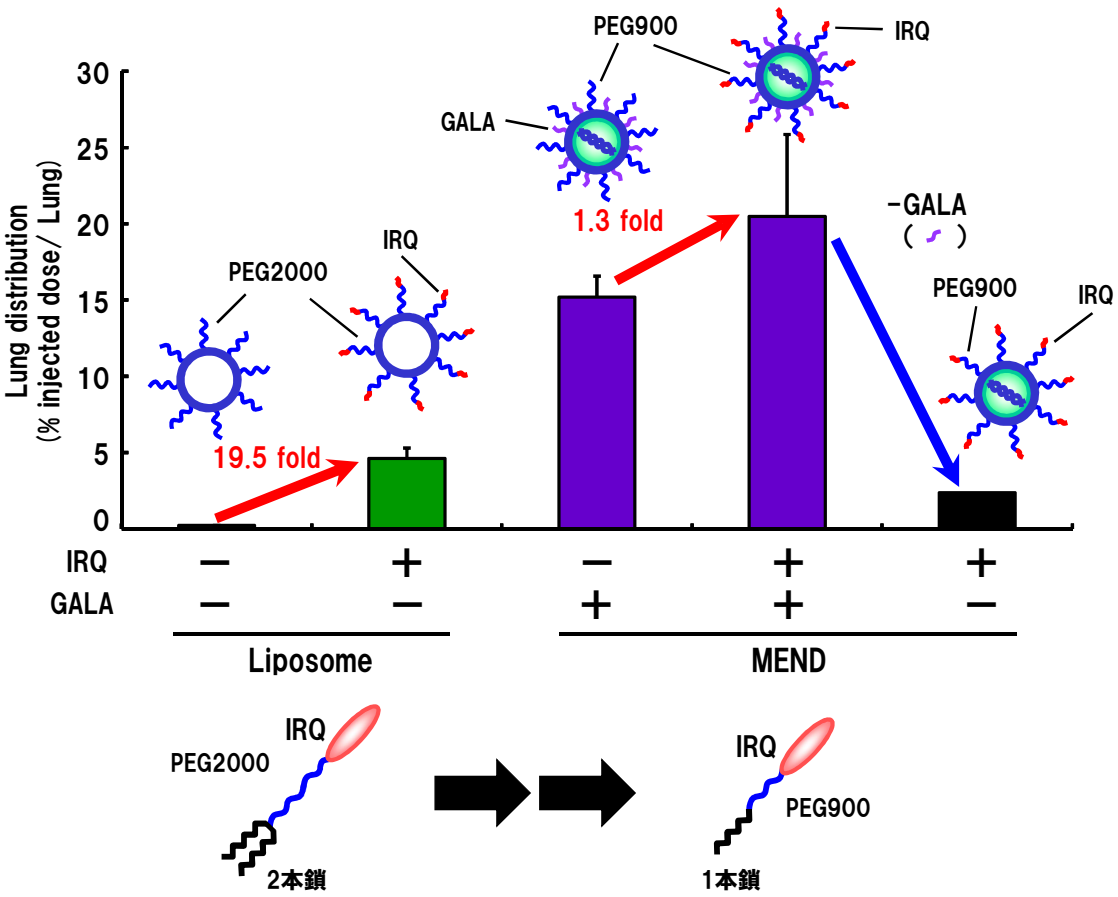



図 1.1-2　IRQ ペプチドの PEG 脂質誘導体の構造変化に伴うキャリアの肺集積量の変化

初期に設計した PEG 脂質誘導体（スペーサー：PEG2000，脂肪鎖：2 本鎖）を Liposome に修飾し肺移行量を評価した際には，IRQ による高い特異性（19.5 倍）が認められたが（緑色のカラム），最終的に設計した PEG 脂質誘導体（スペーサー：PEG900，脂肪鎖：1 本鎖）を MEND に修飾し肺移行量を評価した際には，IRQ による特異性（1.3 倍）が認められなかった（紫色のカラム）．しかし，IRQ を修飾していない MEND (PEG-MEND) においても肺で高い集積が認められ，IRQ 以外に肺移行性を示す素子の存在が示唆された．この素子が何であるかを検討した結果，GALA を外した際に肺移行量が著しく低下し（黒色のカラム），GALA に肺移行性がある可能性が示唆された．

図は，石塚，北海道大学大学院生命科学院，博士学位論文より抜粋した．

## 1.2　GALA 修飾リポソームの体内動態評価

GALA が持つ肺移行性のメカニズム解明の足がかりとして，GALA 修飾リポソームの体内動態を評価した．電気的に中性なリポソームは肺に集積せず，非特異的な細胞への取り込みも乏しいため，Egg phosphatidylcholine (EPC)/ Cholesterol (chol)/ Stearyl-polyethylene glycol 2000 (STR-mPEG) から構成される中性リポソームへの GALA 修飾（GALA-LPs），未修飾時（LPs）における体内動態を評価することにより，肺血管内皮細胞へのリガンド効果を評価した．脂質膜を[$^3$H]標識した各リポソームを投与量 10 μL/g mouse として，ICR マウス（5 週齢，♂）の尾静脈より投与し，投与後，5 分及び 360 分にマウスより肺及び肝臓を摘出し，各臓器に含まれる[$^3$H]の量を液体シンチレーションカウンターにより測定することで各臓器への移行量を評価した．GALA は 7 個のグルタミン酸を含み，負電荷を持つペプチドであることから，LPs への Chol-GALA の修飾により ζ-電位が-7 mV から-23mV に減少した（表 1.2-1）．図 1.2-1 はマウス尾静脈内投与後 5 分及び 360 分における LPs 及び GALA-LPs の肺及び肝臓への集積を示している．GALA-LPs は投与後 360 分において LPs より約 24 倍高い肺集積を示し，その挙動は投与後 5 分で速やかに肺に集積し，360 分においてもその集積は維持されていた一方で，LPs は検出下限付近まで減少していた．また，一般的にリポソームの主なクリアランス臓器と考えられている肝臓への GALA-LPs の集積は大きく減少していることからも，GALA-LPs は効率よく肺をターゲットしていることが支持された．

カチオン性物質を用いた従来の肺送達手法は，凝集塊形成による毛細血管への一時的な捕捉が肺集積の主な要因となっている[42-44]．そこで，N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride (DOTMA)/EPC/Chol/STR-mPEG から構成され，[$^3$H]標識したカチオン性リポソーム (cation-LPs) の体内動態を肺集積キャリアのコントロールとして評価した．その結果，肺集積及びその持続性は GALA-LPs と大きく異なっていた．Cation-LPs は投与後 5 分で速やかに肺に集積するものの，投与後 6 時間でその肺集積は速やかに減少する一方で，肝臓への集積が増加していた．これらのデータより，GALA-LPs は凝集塊形成により一時的に肺毛細血管に捕捉されるカチオン性リポソームとは異なるメカニズムにより肺に集積していることが示唆された．

表 1.2-1　リポソームの物性

| Type of Liposome | Lipid composition | Physicochemical properties | |
|---|---|---|---|
| | | Size (nm) | ζ potential (mV) |
| LPs | EPC/Cholesterol=7:3 | 100±3 | -7±1 |
| GALA-LPs | EPC/Cholesterol=7:3, GALA 2 mol% | 67±3 | -23±3 |
| Cation-LPs | DOTMA/Cholesterol/EPC=3:4:3 | 100±1 | 50±1 |

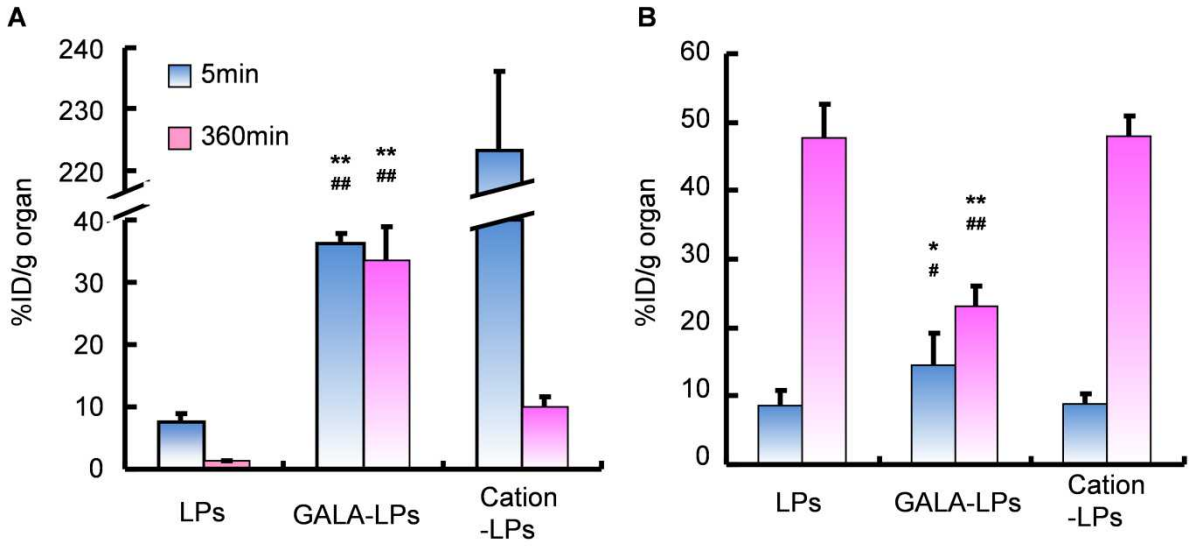



図 1.2-1　GALA-Liposome の肺及び肝臓への分布

[$^3$H]で脂質膜を標識した各 Liposome (10 μL/g mouse) をマウス尾静脈より投与し，5 分後及び 360 分後の各臓器における[$^3$H]カウントを測定した．臓器移行量は，投与量に対する臓器当たりの移行量 (%ID/g organ) として算出した ((A) 肺，(B) 肝臓) (n = 4) ．

*：p< 0.05 (vs LPs)，**：p< 0.01 (vs LPs)，$^{\#}$：p< 0.05 (vs Cation-LPs)，$^{\#\#}$：p< 0.01 (vs Cation-LPs)

## 1.3　IVRTCLSM を用いたマウス耳介皮膚静脈内における GALA-LPs の挙動観察

肺を標的とするカチオン性キャリアは膜表面に負電荷を持つ血球成分と静電気的な相互作用により血流内で凝集塊を形成していると考えられている．そこで，GALA-LPs の血流内における挙動を直接観察することを試みた．血流内においてリポソームが流れる様を明確に捉えるため，麻酔下で BALB/c ヌードマウス（8 週齢，♀）に N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) dioleoylphosphatidylethanolamine（Rho-DOPE）により蛍光ラベルした LPs を尾静脈内投与し，マウス耳介皮膚静脈内を流れるリポソームの挙動をリアルタイム生体内共焦点レーザー顕微鏡（IVRTCLSM）により直接観察した（Cation-LPs; Supplymental Movie 1， LPs; Supplymental Movie 2，GALA-LPs; Supplymental Movie 3）[45]．この動画より，リポソーム投与後 2.2 分の画像を切り出した写真を図 1.3-1 に示した．Cation-LPs はマイクロオーダーの凝集塊を形成していたが，LPs 及び GALA-LPs は蛍光シグナルが分散している様子が観察された．静脈内において，凝集塊が形成されると，凝集塊由来の蛍光強度が強いシグナルと，分散しているキャリア由来の弱いシグナルが観察され，シグナルに大きなバラツキが見られる．この現象を利用することで，凝集の程度は血流内の領域における各ピクセル間の rhodamine 蛍光強度のバラツキを変動係数（C.V.）として算出することにより定量化した（図 1.3-2）[46]．Cation-LPs の C.V.値は大きく変動しながら経時的に減少していった一方で, LPs 及び GALA-LPs の C.V.値は低い値を維持して推移し，C.V.値の変動は見られなかった．よって，GALA-LPs は典型的な肺ターゲットキャリアである Cation-LPs と異なり，凝集塊を形成することなく血流内を流れていることが定量的にも示された．これらの結果より，血流内で凝集をほとんど形成しない GALA-LPs が速やかにかつ長時間肺に集積するためには，肺血管をターゲットする特異的なメカニズムの存在が推察された．

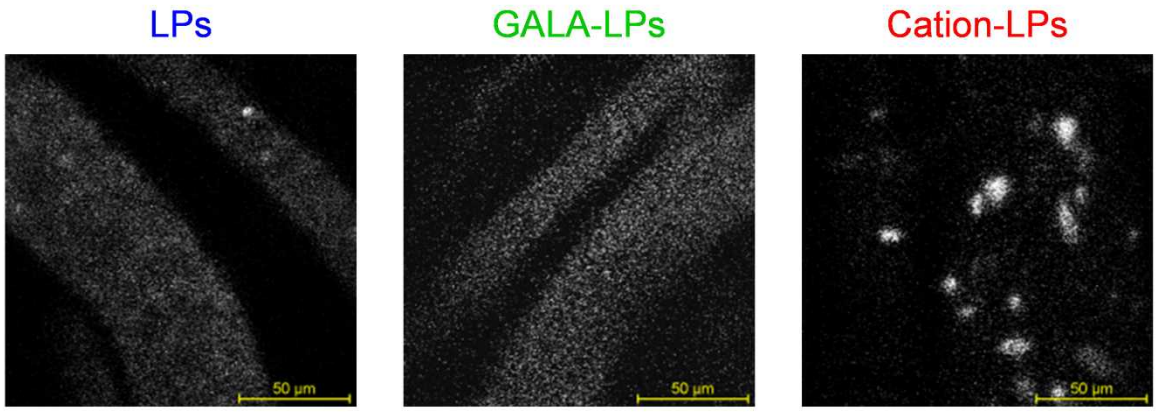



図 1.3-1　マウス耳介静脈血流内における LPs の挙動

Rho-DOPE で標識したリポソームをマウス尾静脈より投与し，IVRTCLSM によりマウス耳介静脈血流内を動画で撮影した．図に示す画像は，リポソーム投与後 2.2 分の様子を示している．

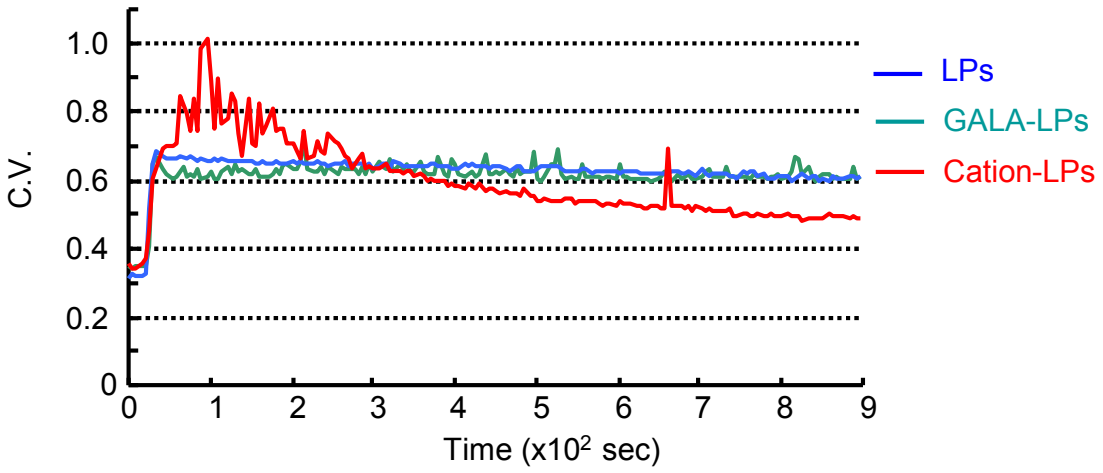



図 1.3-2　C.V.値算出によるリポソームの凝集定量評価

凝集の程度は得られた動画から 5 秒毎に抽出した画像中の rhodamine 蛍光強度の変動係数（C.V.）を用いて定量化した．C.V.値は血管領域中から抽出した関心領域（ROI）における蛍光強度の標準偏差を平均値で除することにより算出している．算出した C.V.値は 5 秒ごとにプロットした．

## 1.4　GALA-LPs のターゲット分子同定

GALA が肺血管内皮細胞標的化リガンドとして機能している可能性が示されたものの，過去に類似の報告はなく，ターゲットとなる分子の手掛かりがなかった．そこで，GALA はインフルエンザウイルスの HA2 の pH 応答性膜融合性機能を模倣して創られたペプチドであることから，インフルエンザウイルスの取り込み機構に着目した．インフルエンザウイルスは，HA2 が末端にシアル酸を持つ糖鎖を認識することにより，細胞内に侵入することが知られている．細胞膜上に配列が異なる糖鎖が多く提示されているが，その中で HA2 はシアル酸-α2,3-ガラクトース（SAα2,3Gal）糖鎖及びシアル酸-α2,6-ガラクトース（SAα2,6Gal）糖鎖を認識することが報告されている（図 1.4-1）[47-49]．HA2 によるシアル酸糖鎖認識は，HA2 のアミノ酸配列により大きく変化することも報告されている [49]．そこで，GALA は，HA2 とアミノ酸配列は異なっているが，これら糖鎖を認識する可能性があると考えた．

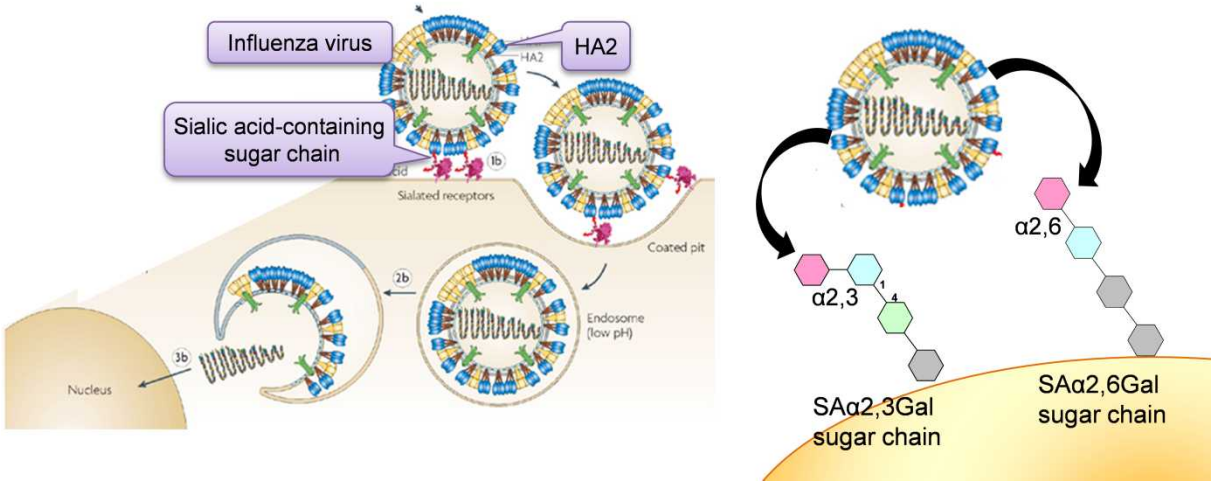



図 1.4-1　インフルエンザウイルスの細胞内取り込みメカニズム

インフルエンザウイルスは，HA2 が末端にシアル酸を持つ糖鎖（シアル酸-α2,3-ガラクトース（SAα2,3Gal）糖鎖及びシアル酸-α2,6-ガラクトース（SAα2,6Gal）糖鎖）を認識し，エンドサイトーシスにより細胞内に侵入する．HA2 は，エンドソーム内の酸性環境下に応答して構造を変化させることによって膜融合能を発揮し，RNA ゲノムが細胞質中に放出される．

図の一部は下記 HP より引用した．

http://www.vanderbilt.edu/vicb/DiscoveriesArchives/targeting_flu_through_host_protein.html

レクチンはシアル酸を持つ糖鎖と特異的に結合することが知られていることから，レクチン存在下及び非存在下におけるリポソームの細胞内取り込みを共焦点レーザー顕微鏡（CLSM）により評価した．細胞は，ヒト肺微小血管内皮細胞由来の HMVEC-L 細胞を用い，リポソームは，脂質膜を Rho-DOPE により蛍光標識した．レクチンは，SAα2,3Gal 糖鎖特異的に結合する Maackia amurensis Agglutinin（MAM）[50, 51] 及び SAα2,6Gal 糖鎖特異的に結合する Sambucus sieboldiana Agglutinin（SSA）[52] を使用し，HMVEC-L 細胞に添加後 30 分間静置した．その後，Krebs 緩衝液を用いて細胞に結合しなかったレクチンを洗い流し，Rho-DOPE により蛍光標識したリポソームを添加 2 時間後に CLSM により観察した．コントロールとして用いた，中性のリポソームは細胞内に全く取り込まれなかったが，このリポソームに GALA を修飾した GALA-LPs は赤のドットが多く観察され，細胞内に取り込まれていた．その取り込みは，1 及び 10 μM の SSA あるいは MAM 存在下において，著しく抑制された（図 1.4-2 及び図 1.4-3）．なお，これらのレクチンによる取り込み阻害は Cation-LPs ではほとんど見られなかったことから，GALA-LPs の取り込み阻害は MAM 及び SSA による非特異的な細胞機能の乱れが要因ではないことを確認している．

しかしながら，この結果だけでは，GALA が糖鎖の先端に位置するシアル酸構造を認識している可能性も考えられたため，シアル酸の中で代表的な分子種である N-アセチルノイラミン酸添加による競合阻害実験を行った．1 及び 10 μM の N-アセチルノイラミン酸を HMVEC-L 細胞に添加 30 分後に，リポソームを添加し N-アセチルノイラミン酸共存下で 2 時間静置後，CLSM によ

り観察した．その結果，N-アセチルノイラミン酸による GALA-LPs の取り込み阻害はほとんどみられなかった（図 1.4-2 及び図 1.4-3）．Cation-LPs についても同様の結果であった．これらの結果より，GALA-LPs はインフルエンザウイルスと同様に，糖鎖末端のシアル酸残基でなく，シアル酸を含む糖鎖配列を認識し，細胞内に取り込まれることが示唆された．

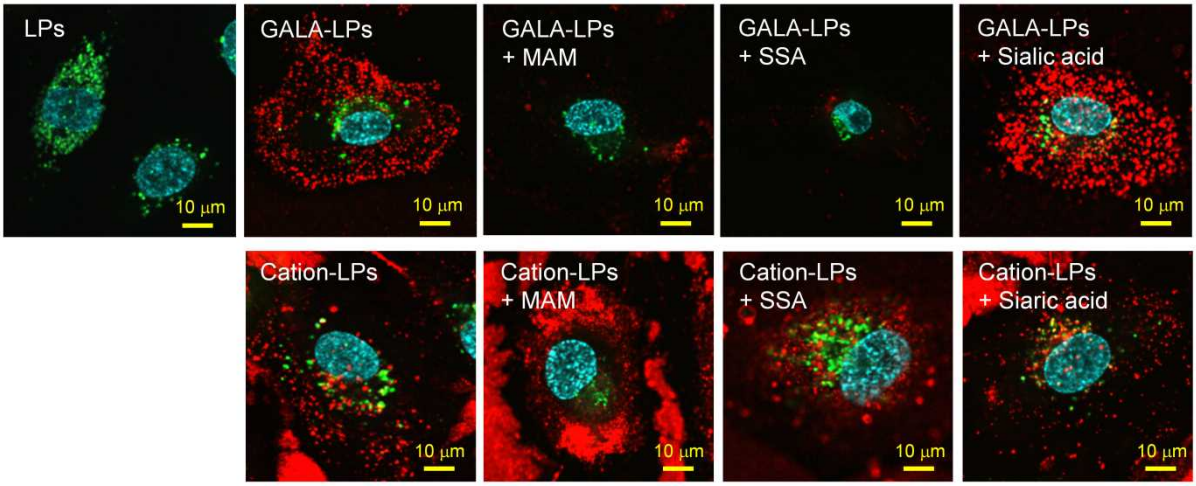



図 1.4-2　10 μM レクチンによる GALA-LPs の取り込み阻害効果

10 μM レクチン（MAM あるいは SSA）で 30 分間前処置後，余剰のレクチンを除去した HMVEC-L 細胞に，脂質膜を Rho-DOPE で蛍光標識したリポソームを添加し，2 時間後に CLSM により観察した．10 μM N-アセチルノイラミン酸（Sialic acid）は 30 分間前処置後，除去せずにリポソームを添加し，共存下で 2 時間静置後に CLSM により観察した．

赤：リポソーム（Rho-DOPE），緑：後期エンドソーム/リソソーム（Lysotracker Green）青：核（Hoechst33342）

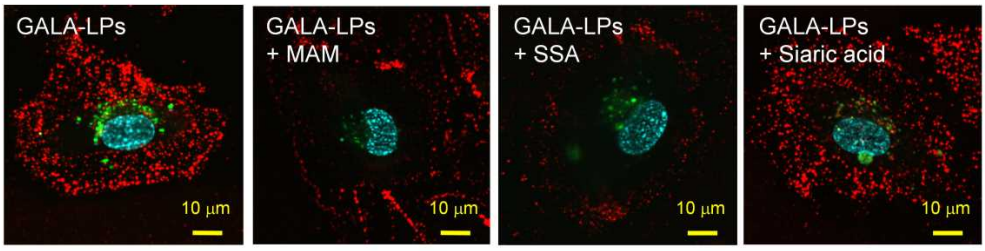



図 1.4-3　1 μM レクチンによる GALA-LPs の取り込み阻害効果

1 μM レクチン（MAM あるいは SSA）で 30 分間前処置後，余剰のレクチンを除去した HMVEC-L 細胞に，脂質膜を Rho-DOPE で蛍光標識した GALA-LPs を添加し，2 時間後に CLSM により観察した．1 μM N-アセチルノイラミン酸（Sialic acid）は 30 分間前処置後，除去せずにリポソームを添加し，共存下で 2 時間静置後に CLSM により観察した．

赤：リポソーム（Rho-DOPE），緑：後期エンドソーム/リソソーム（Lysotracker Green）青：核（Hoechst33342）

## 1.5　GALA と異なるエンドソーム脱出素子（INF7）の肺移行性評価

原島研究室では，GALA ペプチド以外に MEND に修飾可能なエンドソーム脱出素子として，INF7 ペプチドを用いている [53]．INF7 は HA2 の膜融合ドメインを一部改変したペプチド（GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYG）であり [54]，GALA と同様に中性条件下ではランダムコイル構造をとり，エンドソーム内の酸性条件下で膜破壊機能を持つ α-ヘリックス構造へと変化する．このように GALA と同様の機能を持つ INF7 の肺移行性機能を，これらペプチドを修飾した pDNA 封入 MEND（1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP)/Chol/EPC）の *in vivo* 肺集積性により評価した．脂質膜を[$^3$H]標識した各 MEND を投与量 10 μL/g mouse として，ICR マウス（5 週齢，♂）の尾静脈より投与し，その 6 時間後にマウスより肺を摘出し，肺に含まれる[$^3$H]の量を液体シンチレーションカウンターにより測定することで肺移行量を評価した．その結果，GALA 修飾 MEND は高い肺集積性を示したが，INF7 修飾 MEND は未修飾 MEND と同程度の肺集積量であったことから，肺移行性機能は pH 応答性ペプチドに共通する機能ではないことが示された（図 1.5-1）．

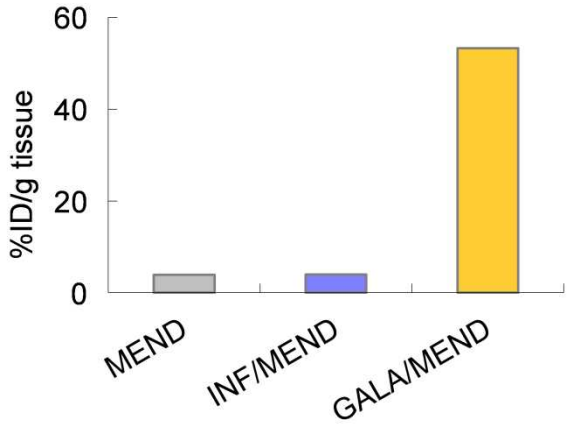



**図 1.5-1　pDNA 封入 MEND の *in vivo* マウス肺集積性**

[$^3$H]で脂質膜を標識した各 MEND(10 μL/g mouse) をマウス尾静脈より投与し，6 時間後の肺における[$^3$H]カウントを測定した．肺移行量は，投与量に対する臓器当たりの移行量 (%ID/g organ) として算出した（n = 2）．

## 1.6　まとめ

GALA は，創製されてから 20 年以上に渡り pH 応答性の膜融合性ペプチドとして用いられてきたが, 新しい機能として発見された肺移行性メカニズムを解明すべく, 本章では検討を進めた．評価は電気的に中性の LPs，この LPs に GALA を修飾した GALA-LPs 及び肺集積キャリアのポジティブコントロールとして Cation-LPs を用いて，*in vivo* 体内動態及び *in vitro* 細胞内取り込み実験を実施した．GALA-LPs の *in vivo* マウス体内動態は，投与 5 分後から肺に移行し，その後 6 時間経過後も集積量は維持されており，LPs の約 24 倍高い集積性を示した．一方で，

Cation-LPs は投与 5 分後に著しく高い肺集積を示すものの，その後速やかに消失し，投与 6 時間後には GALA-LPs の 1/3 以下であった．次に，これらキャリアの血流内の様子を IVRTCLSM により可視化し，動画を撮影した．その結果，一過性の肺集積を示した Cation-LPs はマイクロオーダーの凝集塊を形成して血流内を流れていた一方で，GALA-LPs は凝集塊を形成することなく分散して流れていた．これまで，カチオン性物質を用いた肺標的型キャリアは，血球成分との *in vitro* 凝集評価，*in vivo* 肺血管の塞栓痕から，血球成分との凝集塊形成が肺集積の要因と推察されてきていたが [55]，IVRTCLSM を用いた評価により血流内で凝集塊を形成していることが直接証明された．一方で，GALA-LPs は肺集積キャリアであるにも関わらず，凝集塊を形成せず血流内を分散して流れていることから，従来の肺標的型キャリアと異なり肺塞栓リスクは低いことが示されると同時に，何かしらのリガンドを介して肺に集積していることが示唆された．

リガンド探索として，GALA は HA2 の pH 応答性膜融合性機能を模倣して創製されたことをヒントに，HA2 が膜融合以外に持つシアル酸糖鎖認識能に着目した．少し飛躍した仮説ではあったものの，レクチンを前処置した HMVEC-L 細胞を用いた評価により，GALA-LPs はインフルエンザウイルスと同様にシアル酸構造ではなく，細胞膜上に提示されているシアル酸糖鎖（SAα2,3Gal 糖鎖及び SAα2,6Gal 糖鎖）を認識して細胞内に取り込まれることが示唆された（図 1.6-1）．しかしながら，シアル酸糖鎖は肺血管内皮細胞だけでなく，他の血管内皮の細胞膜上にも提示されている [56]．また，石塚は GALA-LPs が非血管内皮細胞と比較して，血管内皮細胞に高い特異性を有し，血管内皮細胞間では取り込みに違いがないことを明らかにしている（図 1.6-2）[38]．それにも関わらず，肺に特異的に集積することについて，肺は毛細血管面積が他の臓器に比べて極めて大きく，静脈内投与後のファーストパス臓器であることが関係していると考えている．

ここまで，GALA のメカニズムを解明してきたが，本章の検討を通して新たに GALA の興味深い特徴が見えてきた．まず，GALA と同様に pH 応答性エンドソーム脱出素子であり，HA2 の膜融合ドメインを一部改変したペプチドである INF7 ペプチドは，肺集積性を持たないことである．次に，GALA は HA2 が酸性条件下で α-helix 構造をとることに着目して創製されたペプチドであり，HA2 のシアル酸糖鎖認識ドメインは膜融合ドメインと異なる場所に位置し，GALA と HA2 のシアル酸糖鎖ドメインのアミノ酸配列は異なることである．最後に，シアル酸糖鎖は負電荷を帯びており，負電荷を持つ GALA がシアル酸糖鎖を認識するには，静電気的反発を乗り越えなければならないことである．このように興味深い点はまだ多く残されており，今後の研究を進めることにより，GALA のシアル酸糖鎖認識様式の解明，GALA よりシアル酸糖鎖への特異性，親和性の高い新規ペプチドの創製につながると考えている．

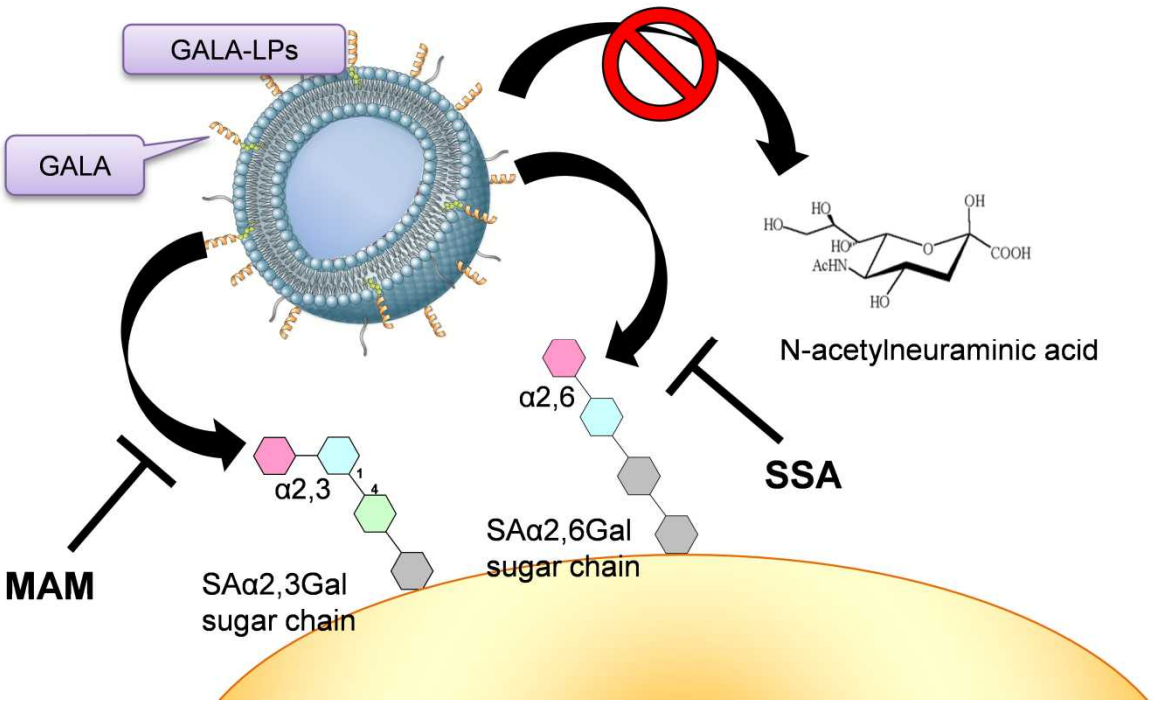



図 1.6-1　GALA-LPs の肺血管内皮細胞標的化メカニズムの模式図

GALA-LPs はインフルエンザウイルスと同様に，糖鎖末端のシアル酸残基でなく，細胞膜上に提示れているシアル酸を含む糖鎖配列を認識し，細胞内に取り込まれると考えられる.

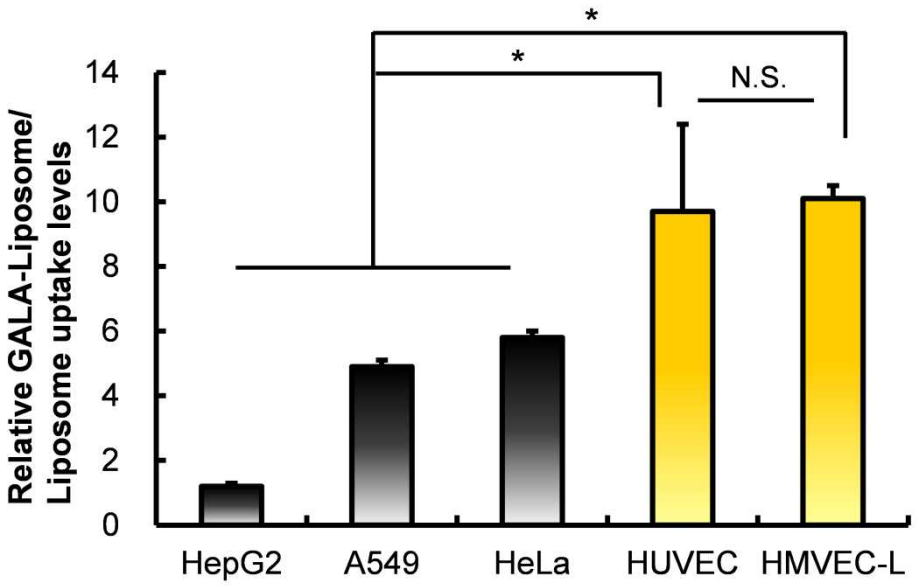



図 1.6-2　非血管内皮細胞及び血管内皮細胞における GALA-LPs の細胞内取り込み評価

脂質膜を NBD-DOPE で蛍光標識した Liposome 及び GALA-Liposome を各細胞に添加し，1 時間後の細胞取り込み量を FACS で評価した．各細胞（HepG2：ヒト肝癌細胞，A549：ヒト非小細胞癌細胞，HeLa：ヒト子宮癌細胞, HUVEC: ヒト臍帯静脈内皮細胞, HMVEC-L）での GALA-Liposome の取り込み量（平均蛍光強度）を Liposome の取り込み量で除することにより GALA による取り込み増加効果を評価した（n = 3-4）.

* : $p < 0.01$，N.S.: not significant difference

図は，石塚，北海道大学大学院生命科学院，博士学位論文より抜粋した.

# 第 2 章

# GALA/MEND を用いた siRNA による肺疾患治療応用

# 第2章. GALA/MEND を用いた siRNA による肺疾患治療応用

## 2.1　緒言

これまで，製薬業界において主役であった低分子薬開発は様々な疾患の治療薬を生み出し，人類の健康と福祉の発展に貢献してきた．しかし，その創薬は標的分子を同定後，標的分子への親和性が高い化合物のスクリーニング，体内動態，安全性，物性などを踏まえた化学構造の最適化を経るため，多大な時間と費用を要している．一方で，siRNA は標的分子の同定後，速やかに siRNA 配列を設計することが可能であり，その特異性は高く，親和性も数 pM と低分子に対して大きなアドバンテージを持っている [57].

近年開発のめざましい抗体医薬は，標的分子への特異性・親和性が非常に高いことから，少ない副作用で高い効果が得られる治療薬として開発され, その市場規模は世界で 400 億ドルを超え，今後もその市場はさらに拡大すると予測されている [58]．しかしながら，抗体は細胞内の分子を標的とすることはできず，標的可能な分子は細胞膜の表面に発現する分子のみに制限される．一方で，siRNA は標的分子の発現場所に関わらず，理論上すべての分子の mRNA を制御することが可能であり，低分子，抗体では治療が困難なアンメットメディカルニーズを克服する次世代医薬として期待されている．

肺疾患は，序論でも述べたようにアンメットメディカルニーズを多く抱える臓器であり，治療薬の開発だけでなく，肺への薬物送達技術の開発も肺疾患治療戦略の重要な位置づけを占めている．肺への薬物送達経路は，気道を介した吸入投与による肺実質細胞への送達と静脈内投与を介した肺血管内皮細胞への送達の２つに大別される．吸入投与は，気管支疾患，喘息，慢性閉塞性肺疾患など気管，肺胞の上皮細胞が関与する疾患に対して，全身性の副作用を抑制し，ターゲット細胞に高濃度での薬物送達を可能としており [59]，吸入剤は数多く上市されている [60]．一方で，静脈内投与型の肺血管内皮標的キャリアは実用化に至っていない．しかしながら，肺血管内皮細胞は肺高血圧症 [8, 9]，急性肺障害/急性呼吸促迫症候群 [61, 62] など致死率の高い疾患に直接関与しており，さらに，肺がん及び癌細胞の肺転移にも関与していることが報告されており [63] [64]，肺血管内皮標的型キャリアの開発はこれら疾患の治療薬開発に寄与することが期待される．また，ゲノム解析と分子機構の解明が進むとともに，これら疾患も原因遺伝子の同定が急速に進められている．

このように，肺血管内皮細胞は肺疾患治療戦略における重要なターゲット細胞の 1 つであることから，siRNA などの核酸を肺血管内皮細胞に送達するキャリアも研究が行われている [65-67]．従来の肺標的型の核酸送達キャリアはカチオン性物質が主に用いられており，キャリアが持つ正電荷が細胞への結合及びエンドソーム脱出のドライビングフォースとなっている [44, 68, 69]．しかしながら，カチオン性キャリアは，血球成分との凝集体を形成し，毛細血管内を一時的に閉塞させることが肺集積の要因となっている [42-44]．従って，カチオン性材料の利用は微小梗塞，組織虚血，心筋傷害など臨床使用上の問題を引き起こすリスクを伴っている [55]．肺ターゲットを成功させる

ためにはこのようなリスクを回避し，かつ能動的なターゲットを可能にする技術が必要となる．さらに，核酸送達を実現するためには，前述した体内動態制御に加え，細胞内取り込み及びエンドソーム脱出による細胞質への siRNA の放出を含む細胞内動態制御も重要となる．

GALA は，元来持つ細胞内動態改善機能に加え，第 1 章で詳細を明らかにした肺血管内皮標的能と 2 つの機能を併せ持つ dual functional peptide であり，この機能を利用して，siRNA 送達による肺疾患治療への応用展開を試みた．

## 2.2　核酸送達に及ぼす PEG 脂質誘導体の影響

siRNA などの核酸を送達する人工ベクターの構築を考える上で, 粒子表面で水和層を形成する PEG は重要な役割を果たす．PEG は，細網内皮系による補足回避による血中滞留性の向上，粒子の凝集抑制による保存安定性改善などの機能 [70-72] をキャリアに付加する一方で，キャリアの細胞内取り込み及びエンドソーム脱出の抑制に伴う核酸の機能発現効率の低下をもたらす [32, 73, 74]．このように，PEG のジレンマと呼ぶ問題に直面する．しかしながら，実用性を考える上で，保存安定性は非常に重要な項目であり，粒子の凝集を抑制する PEG は必要な構成成分と考えている．そこで, siRNA によるノックダウン検討に先駆けて, 核酸送達に最適な PEG 選定の検討を pDNA を封入した GALA/MEND を用いて行った．PEG は親水性が高く，そのままでは MEND 脂質膜に修飾することができないため，PEG を脂質誘導体化し，この脂質構造をアンカーとすることで脂質膜への挿入を可能にしている．そこで，今回，MEND への PEG 修飾に必須となる PEG 脂質誘導体の脂質構造に着目した． 2 本鎖脂質構造を持ち，DDS 分野で汎用され，DOXIL の構成成分としても知られる 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phospho-ethanolamine-N-[methoxy-(polyethylene glycol)-2000]（DSPE-mPEG）[75]，1 本鎖脂質構造を持つ Stearyl-mPEG2000（STR-mPEG），これらとは大きく構造が異なる Cholesteryl- mPEG2000（Chol-mPEG）[76] と 3 種類の PEG 脂質誘導体が GALA/MEND の体内動態及び細胞内動態に及ぼす影響を評価した. なお, 本項で用いた MEND は protamine と pDNA を凝縮化したコアを DOTAP/EPC/Chol（3:4:3）から成る脂質膜内に封入し, 5% PEG 脂質及び 2% Chol-GALA を修飾した組成から構成されている．

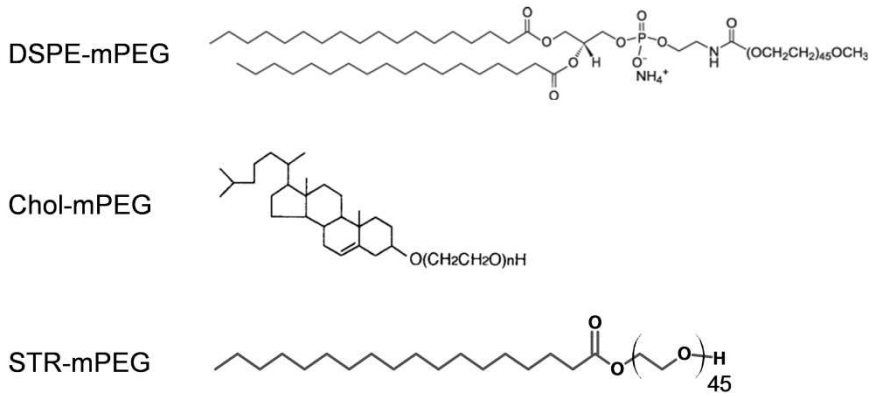



図 2.2-1　PEG 脂質の構造

MEND に修飾した PEG 脂質の構造を示す．1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phospho-ethanolamine-N-[methoxy-(polyethylene glycol)-2000]（DSPE-mPEG），Cholesteryl- mPEG2000（Chol-mPEG）及び Stearyl-mPEG2000（STR-mPEG）．

体内動態は，脂質膜を[$^3$H]標識した各 MEND を投与量 10 μL/g mouse として，ICR マウス（5 週齢，♂）の尾静脈より投与し，投与 24 時間後にマウスより肺を摘出し，肺に含まれる[$^3$H]の量を液体シンチレーションカウンターにより測定することで肺への移行量を評価した．その結果，DSPE-mPEG は GALA による肺移行性を著しく抑制し，GALA 未修飾時と同レベルまで低下していた．一方で，STR-mPEG 修飾 GALA/MEND は PEG 未修飾時と同程度の肺移行性を示し，GALA の肺移行性機能に影響を及ぼさないことが示唆された（図 2.2-2）．

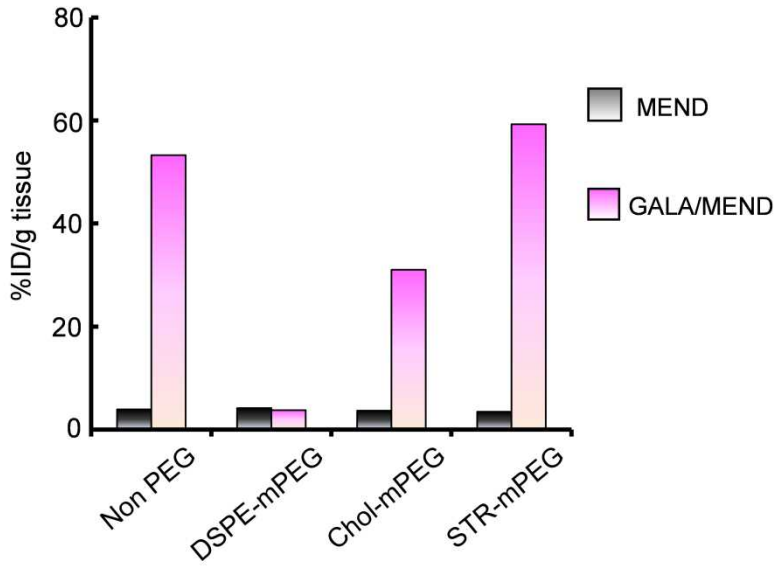



図 2.2-2　pDNA 封入 MEND の *in vivo* マウス肺集積性

[$^3$H]で脂質膜を標識した各 MEND（10 μL/g mouse） をマウス尾静脈より投与し，24 時間後の肺における[$^3$H]カウントを測定した．肺移行量は，投与量に対する臓器当たりの移行量（%ID/g organ）として算出した（n = 2）．

細胞内動態は，pDNA 封入 MEND のマウス胎児肺間葉細胞（MFLM-4）におけるルッシフェラーゼ遺伝子発現活性を測定することにより評価した．ルッシフェラーゼ遺伝子をコードした pDNA を封入した MEND を MFLM-4 細胞に遺伝子導入し，24 時間後のルッシフェラーゼ活性を測定した. その結果, PEG 未修飾 GALA/MEND は非常に高い遺伝子発現活性を示したものの，DSPE-mPEG の修飾により遺伝子発現活性が PEG 未修飾 MEND と同程度まで抑制された．一方で，Chol-mPEG 及び STR-mPEG 修飾時における GALA/MEND の遺伝子発現活性は PEG 未修飾時と同程度を維持していたことから, Chol-mPEG 及び STR-mPEG は GALA/MEND の細胞内動態に悪影響をもたらさないことが示唆された.

GALA/MEND を用いて肺血管内皮細胞をターゲットする上で，体内動態及び細胞内動態の観点からは PEG は必要ないことが示唆されたが，PEG 未修飾 MEND は調製後数日で凝集沈殿することを確認している．一方で，PEG 脂質の種類に関係なく，PEG 修飾 MEND はこの凝集を回避できたことから，保存時の凝集回避に PEG 修飾は有効と考えた（データ未掲載）.

これらの結果より，GALA/MEND の保存安定性を改善し，体内動態及び細胞内動態に影響を与えない STR-mPEG は PEG のジレンマを回避する PEG 脂質として選定し, siRNA によるノックダウン検討時に使用する GALA/MEND には STR-mPEG を組み込むこととした.

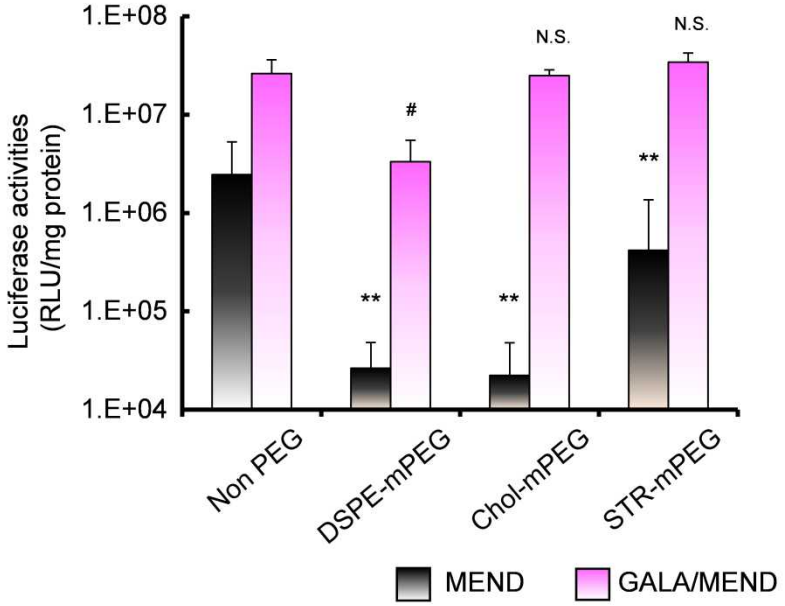



図 2.2-3　pDNA 封入 MEND の MFLM-4 細胞における *in vitro* 遺伝子発現活性

ルッシフェラーゼ遺伝子をコードした pDNA を DOTMA/Chol/EPC から構成される MEND に封入した．5 mol% PEG 脂質と 2 mol% Chol-GALA を修飾した MEND を MFLM-4 細胞に遺伝子導入し，24 時間後のルッシフェラーゼ活性を測定した（n=3-4）. MEND のルシフェラーゼ活性はタンパク質量当たりの相対蛍光強度（RLU/mg protein）として算出した.

** : p＜0.01（vs PEG 未修飾 MEND），# : p< 0.05（vs PEG 未修飾 GALA/MEND），N.S.: not significant difference（vs PEG 未修飾 GALA/MEND）

## 2.3　siRNA 封入 GALA/MEND の調製

siRNA 封入 GALA/MEND は，肺血管内皮標的化キャリアとして組成が最適化された pDNA 封入 IRQ-PEG-MEND の組成を参考とした [41]．siRNA の凝縮化剤として，プロトンスポンジ効果によりエンドソーム膜破壊作用を有する polyethylenimine（PEI）[77] を用いて siRNA コアを調製した．siRNA コアはカチオン性脂質膜でコートするため，表面電荷が負となるように siRNA に対して PEI を添加した．

MEND の脂質二重膜は，DOTMA/Chol/EPC/STR-PEG をモル比（30/40/30/5 mol%）で調製し，Chol-GALA は 2 mol%を MEND に修飾した（GALA/MEND）（図 2.3-1）．この MEND は正電荷を持つ脂質二重膜と負電荷を持つ siRNA コア粒子の静電気的な相互作用を利用することで効率よくパッケージングすることを可能にしている．カチオン性脂質として選択した DOTMA は，グリセロール骨格と脂肪鎖がエーテル結合により結合されているため，生体内で分解されにくく，遺伝子導入効率が高いことが報告されている [78, 79]．Cholesterol は，血中におけるリポソームの脂質膜安定性に寄与すること [80-83]，EPC は安定な脂質膜構造であるラメラ構造形成により製剤的安定性が向上すること [84] を期待して選択した．STR-PEG は 2.2 で述べたように，製剤的安定性，細胞内動態及び体内動態のバランスに優れていることから選択した．調製した siRNA コア及び GALA/MEND の物性を表 2.3-1 に示した．

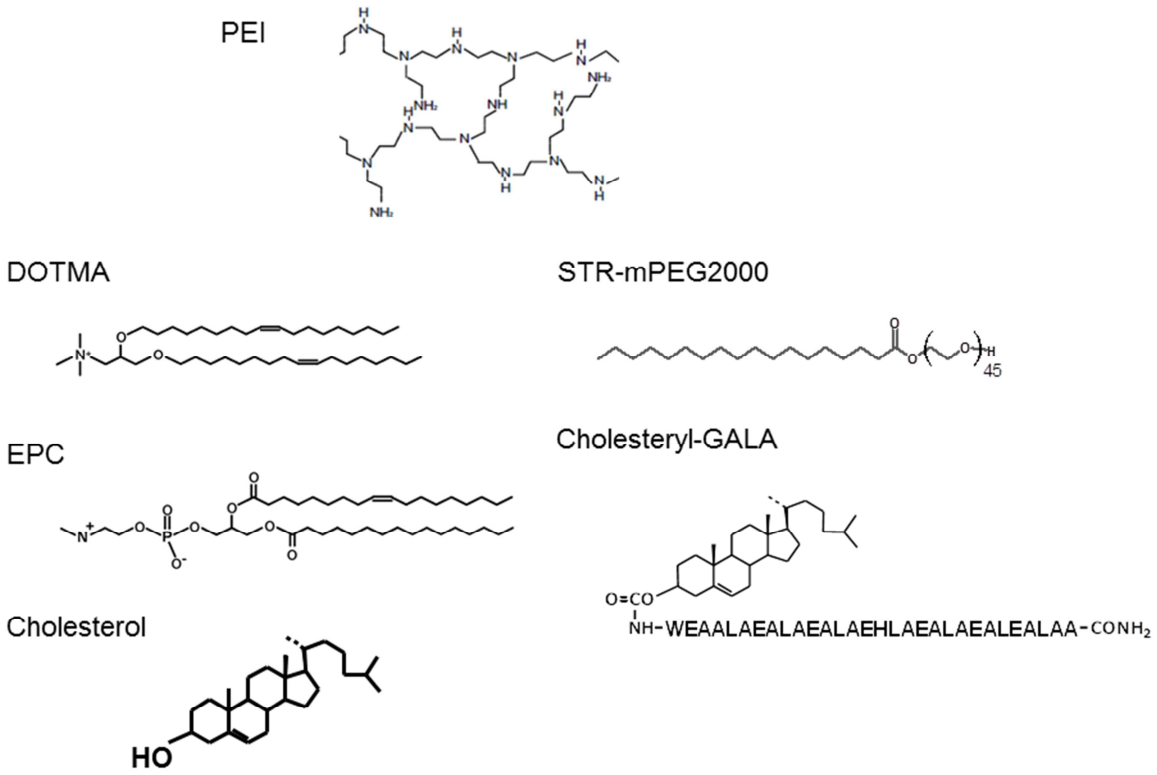



図 2.3-1　GALA/MEND の構成成分

表 2.3-1　siRNA コア及び GALA/MEND の粒子径・ζ電位

| | Size (nm) | PDI | ξ-potential (mV) |
|---|---|---|---|
| siRNA core | 109±13 | 0.243±0.057 | -25±5 |
| MEND | 148±5 | 0.222±0.016 | 29±2 |
| GALA/MEND | 107±11 | 0.285±0.045 | 15±2 |

## 2.4　siRNA 封入 GALA/MEND の *in vivo* 肺血管内皮細胞ノックダウン評価

siRNA 封入 GALA/MEND の *in vivo* 肺血管内皮細胞ノックダウン効果を評価した．血管内皮細胞のマーカー遺伝子である CD31 を標的とする siRNA（siCD31）を封入した GALA/MEND を 0.2-4.0 mg siRNA/kg の投与量で C57BL/6N マウス（6 週齢，♂）の尾静脈より投与し，その 24 時間後に肺を摘出した．摘出した肺から mRNA を抽出し，CD31 と同様に血管内皮細胞のマーカー遺伝子である CD34 に対する CD31 mRNA の相対発現量を定量的 RT-PCR（qRT-PCR）法により解析した．

GALA 未修飾である MEND 投与時には，2.0 mg siRNA/kg 以上の投与量で肺におけるノックダウンが観察されたのに対し，GALA/MEND 投与時には 0.5 mg siRNA/kg で明らかなノックダウンが観察された（図 2.4-1）．さらに，このシステムによるノックダウン効果は，現在臨床第 I 相試験を実施中の AtuPLEX を越えるものであった． AtuPLEX は Silence Therapeutics 社により開発された肺血管内皮細胞を標的とする lipoplex 様の siRNA デリバリーシステムであり [85-87]，肺血管内皮標的 siRNA キャリアとして最も開発が進んでいる．AtuPLEX は，3.0 mg siRNA/kg を投与することにより，約 60%の肺血管内皮細胞の遺伝子ノックダウン効果が得られている．このように GALA/MEND は非常に優れた siRNA デリバリーシステムであることが示唆された．

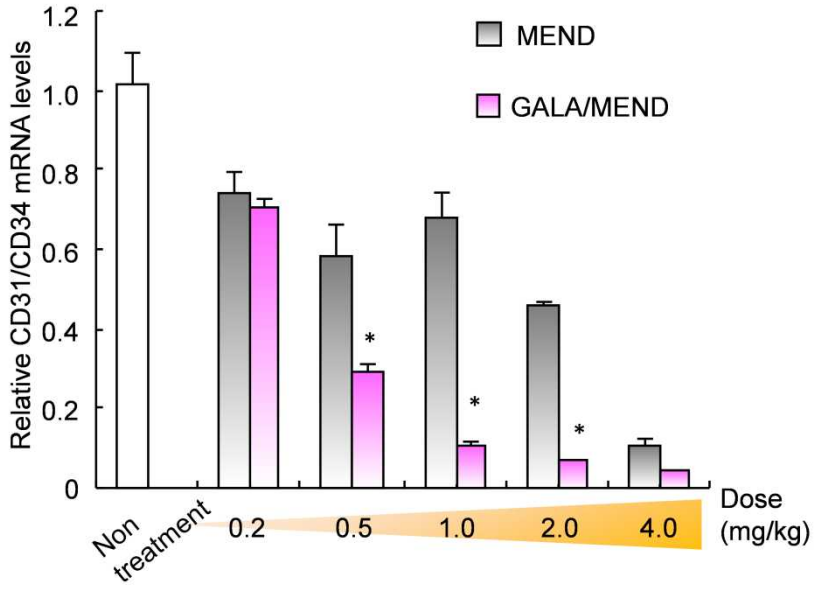



図 2.4-1　MEND 及び GALA/MEND の肺血管内皮細胞ノックダウン評価

siCD31 を封入した MEND 及び GALA/MEND（0.2-4.0 mg siRNA/kg）を C57BL/6N マウスに尾静脈内投与し，24 時間後に肺を摘出し，mRNA 量を qRT-PCR 法により測定した（n=3-5）．縦軸は CD31 の mRNA 量を CD34 の mRNA 量で補正した値を示す．

* : p< 0.01 (vs 各 dose の MEND)

## 2.5　PEG 脂質が GALA/MEND の保存安定性及びノックダウンに及ぼす影響

2.4 において，GALA/MEND は肺血管内皮細胞を標的とする優れた siRNA キャリアであることが立証された．GALA/MEND 組成が適正であるかを検証することを目的として，本項では，PEG 脂質に着目し，製剤としての保存安定性とノックダウン効果について評価した． 2.2 において，二本鎖脂質構造を持つ DSPE-mPEG より一本鎖脂質構造を持つ STR-mPEG の方が GALA の機能を損なわなかったことから，STR-mPEG に加えて，DSPE-mPEG より一本鎖脂質構造に近い N-octanoyl-sphingosine-1-{succinyl [methoxy (polyethylene glycol) 2000]}（C8Cera-mPEG）の 2 つの PEG 脂質を用いて，1~10mol% 修飾した GALA/MEND を調製した．

GALA/MEND への STR-mPEG 及び C8Cera-mPEG の修飾量の増加に伴い，粒子径，PDI 及びζ-電位いずれも小さくなる傾向が見られた（表 2.5-1）．粒子径の減少は，PEG 脂質修飾による脂質膜枚数の減少が要因と考えられた．また，PDI の減少は脂質膜枚数の均一化により粒度分布が均一になったためと推察され，PEG 脂質修飾量の増加は粒子の均一化に寄与することが示唆された．ζ-電位の低下については，PEG が脂質膜表面に水和層を形成したことにより，カチオン性脂質による正電荷がマスクされたためと考えられた．PEG 未修飾 GALA/MEND は調製後翌日に明らかな沈殿物が確認されるものの，PEG 脂質の修飾により凝集・沈殿は抑制され，成り行き室温下で調製後 1 ヶ月を経ても沈殿は見られなかったことから PEG 脂質の修飾は MEND の保存安定性向上に大きく寄与することが示唆された．

表 2.5-1　PEG 脂質修飾 GALA/MEND の物性

| PEG脂質修飾量 | | 物性 | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 平均粒子径 (nm) | PDI | ζ-potential (mV) |
| nonPEG | | 160 | 0.279 | 33 |
| STR-PEG2000 | 1% | 139 | 0.366 | 27 |
| | 5% | 107 | 0.285 | 15 |
| | 10% | 104 | 0.220 | 13 |
| C8Cera-PEG2000 | 1% | 139 | 0.299 | 22 |
| | 5% | 120 | 0.245 | 12 |
| | 10% | 102 | 0.232 | 13 |

次に，STR-mPEG あるいは C8Cera-mPEG を 1, 5, 10 mol%修飾した siCD31 封入 GALA/MEND 1 mg siRNA/kg を C57BL/6N マウス尾静脈より投与し，その 24 時間後に肺を摘出した．摘出した肺から mRNA を抽出し，CD34 に対する CD31 mRNA の相対発現量を qRT-PCR 法により定量することでノックダウン効果を評価した．その結果，STR-mPEG 及び C8Cera-mPEG 修飾 GALA/MEND 共に修飾量が 5%までは PEG 未修飾時と同様に約 80%のノックダウン効果が得られたが，PEG を 10%修飾した GALA/MEND のノックダウン効果は約 70%とその効果が減弱する傾向がみられた．STR-mPEG 及び C8Cera-mPEG の修飾がノックダウン効果を抑制しにくい要因として, 一本鎖脂質構造あるいはそれに近い構造を持つ PEG 脂質は脂質のアンカーとしての機能が弱く, 血中で GALA/MEND が希釈された際に PEG 脂質が徐々に抜けていることが考えられた [88]．一方，10 mol%修飾 GALA/MEND のノックダウン活性が低下したことについて, 肺到達時に活性に影響を与えるだけの PEG 脂質が GALA/MEND 表面に残存しているためと推察された．ノックダウン効果は，これら 2 種類の PEG 脂質に違いは見られなかったが，C8Cera-mPEG を 5%以上修飾した GALA/MEND を 4 mg siRNA/kg 投与し，24 時間後に開腹した際，胸水の貯留が認められた．一方，STR-mPEG 修飾 GALA/MEND ではこのような現象が見られなかったことから，C8Cera-mPEG 自身が毒性を有していることが示唆された．以上の検討より, STR-mPEG は GALA/MEND の機能を保持しながら保存安定性を改善する素子として有用であり，修飾量は 5 mol%が適正であることが示された．

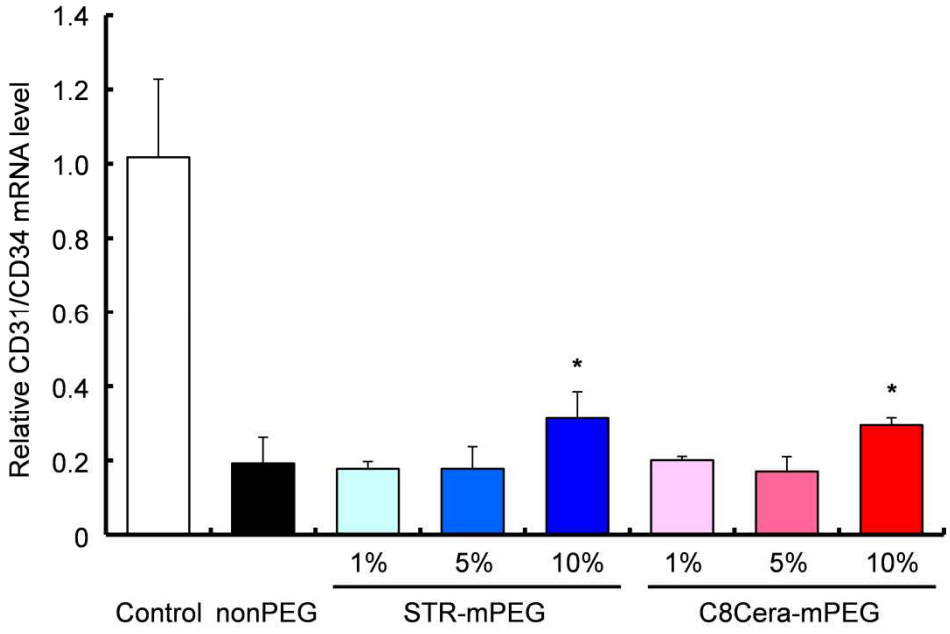



図 2.5-1　PEG 脂質修飾が GALA/MEND の肺ノックダウン効果に及ぼす影響評価

STR-mPEG あるいは C8Cera-mPEG を 1, 5, 10 mol%修飾した siCD31 封入 GALA/MEND（1.0 mg siRNA/kg）を C57BL/6N マウスに尾静脈内投与し，24 時間後に肺を摘出し，mRNA 量を qRT-PCR 法により測定した（n=3）．縦軸は CD31 の mRNA 量を CD34 の mRNA 量で補正した値を示す．

* : < 0.05（vs nonPEG）

## 2.6　GALA 修飾量の最適化

これまで，MEND への GALA 修飾量は 2mol%に固定して実施してきた．そこで，GALA 修飾量の最適値を明らかにすることを目的として，MEND への GALA 修飾量がノックダウン効果に及ぼす影響を評価した．

GALA 修飾量が 1～4 mol%と異なる siCD31 封入 MEND を調製し，0.5-2.0 mg siRNA/kg の投与量で C57BL/6N マウス（6 週齢，♂）の尾静脈より投与し，その 24 時間後に肺を摘出した．摘出した肺から mRNA を抽出し，CD34 に対する CD31 mRNA の相対発現量を qRT-PCR 法により解析した．その結果，1～4 mol% GALA を修飾することにより GALA 未修飾 MEND に比べて肺におけるノックダウン効果は改善され，さらに 1.5～2 mol% GALA 修飾時に GALA/MEND は高いノックダウン効果を示し，2 mol% GALA 修飾時に最も高い効果が得られることを明らかにした（図 2.6-1）．

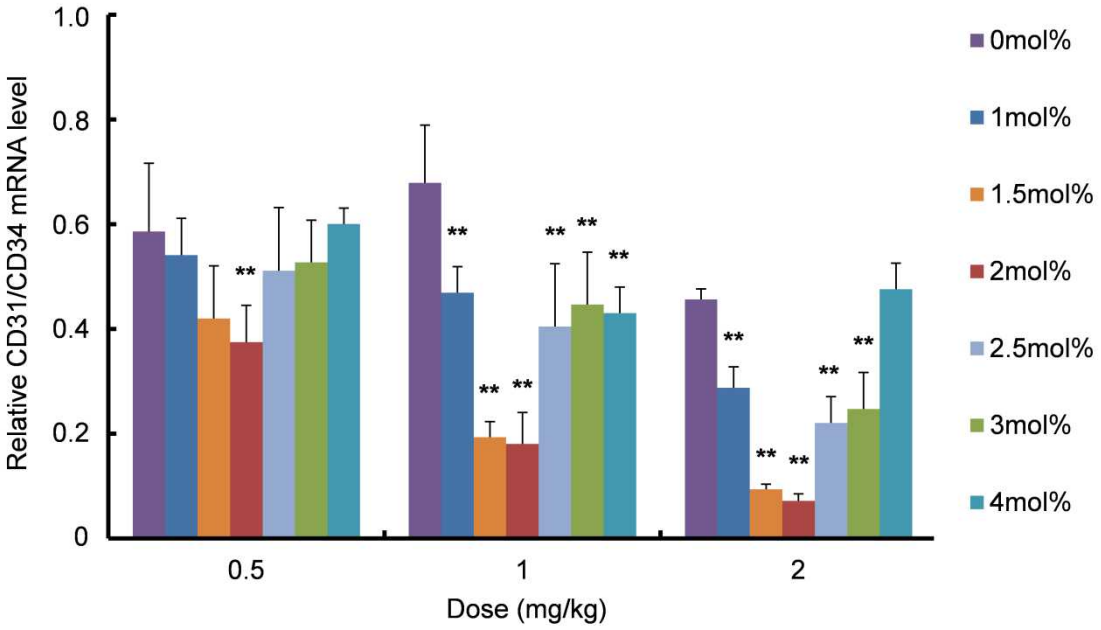



図 2.6-1　MEND への GALA 修飾量が *in vivo* ノックダウン効果に及ぼす影響評価

Chol-GALA を 0-4 mol%修飾した siCD31 封入 GALA/MEND（0.5-2 mg siRNA/kg）を C57BL/6N マウスに尾静脈内投与し，24 時間後に肺を摘出し，mRNA 量を qRT-PCR 法により測定した（n=3）．縦軸は CD31 の mRNA 量を CD34 の mRNA 量で補正した値を示す．

** : p< 0.01（各 Dose の GALA 未修飾 MEND）

## 2.7　MEND の安全性評価

組成の最適化が確認された GALA/MEND（DOTMA/Chol/EPC/STR-PEG/Chol-GALA = 30/40/30/5/2）の単回投与時における安全性を評価することを目的として，MEND 及び GALA/MEND を投与量 2 mg siRNA/kg で C57BL/6N マウス（6 週齢, ♂）の尾静脈内に投与し，24 時間後における血液学的検査，血液生化学的検査及び病理検査を実施した．その結果，MEND 及び GALA/MEND 投与による血液生化学的検査に顕著な変化は見られなかった（表 2.7-1）．一方で，血液学的検査において，MEND の投与により顕著なリンパ球の減少が見られたものの，リンパ球の減少は GALA の修飾により軽減される傾向が見られた（表 2.7-2）．臓器の器質変化について，今回検査した臓器（肺，脾臓，心臓，腎臓，肝臓）は障害が観察されず，GALA/MEND 投与群において 3 例中 2 例で肝臓のグリコーゲンの減少が見られたのみであった（表 2.7-3）．このグリコーゲン減少は軽度な体重減少に伴う GALA/MEND 投与の 2 次的な影響と推察され，安全性上問題となる所見ではないと考えられた．これらの結果より，GALA/MEND 2 mg siRNA/kg の単回投与は直ちに臨床上問題となるような急性毒性が見られず，ノックダウン効果が得られる投与量（0.5 mg siRNA/kg）との乖離が確認できたことから，GALA/MEND は効果と安全性のバランスが取れたキャリアであることが示唆された．

表 2.7-1　MEND 投与後 24 時間における血液生化学的検査

| Sample | AST (UI/L) | ALT (UI/L) | LDH (UI/L) | ALP (UI/L) | ChE (UI/L) | γ-GTP (UI/L) | CK (UI/L) | LIP (UI/L) | GLU (mg/dL) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Non treatment | 39 (3) | 21 (2) | 242 (15) | 547 (13) | 2014 (127) | 0.0 (0.0) | 89 (10) | 42 (1) | 282 (7) |
| MEND | 78 (22) | 42 (13) | 447 (103) | 444 (30) | 2509 (216) | 0.0 (0.0) | 119 (24) | 38 (3) | 264 (4) |
| GALA-MEND | 65 (7) | 34 (16) | 303 (55) | 507 (10) | 2289 (66) | 0.0 (0.0) | 106 (14) | 33 (5) | 356 (110) |

| Sample | T-Cho (mg/dL) | TG (mg/dL) | PL (mg/dL) | NEFA (mEq/L) | TP (g/dL) | ALB (g/dL) | GLB (g/dL) | A/G ratio) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Non treatment | 82 (5) | 69 (4) | 172 (9) | 0.48 (0.05) | 4.6 (0.1) | 1.5 (0.0) | 1.0 (0.0) | 0.49 (0.00) |
| MEND | 105 (2) | 75 (18) | 194 (12) | 0.53 (0.05) | 4.8 (0.1) | 1.5 (0.0) | 1.1 (0.0) | 0.47 (0.01) |
| GALA-MEND | 96 (13) | 44 (11) | 182 (27) | 0.49 (0.08) | 4.7 (0.2) | 1.5 (0.0) | 1.1 (0.0) | 0.49 (0.01) |

| Sample | UN (mg/dL) | CRE (mg/dL) | T-Bil (mg/dL) | Ca (mg/dL) | IP (mg/dL) | Na (mEq/L) | K (mEq/L) | Cl (mEq/L) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Non treatment | 26 (2) | 0.07 (0.01) | 0.09 (0.01) | 9.2 (0.1) | 8.0 (0.5) | 150 (1) | 4.0 (0.1) | 113 (0) |
| MEND | 25 (3) | 0.07 (0.01) | 0.10 (0.02) | 9.2 (0.2) | 8.3 (0.2) | 150 (1) | 4.4 (0.17) | 115 (1) |
| GALA-MEND | 21 (0) | 0.06 (0.01) | 0.11 (0.02) | 9.1 (0.1) | 8.2 (0.3) | 151 (1) | 4.45 (0.11) | 115 (1) |

AST:アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ，ALT:アラニントランスアミナーゼ，LDH:血清乳酸脱水素酵素，ALP:アルカリフォスファターゼ，ChE:コリンーエステラーゼ，γ-GTP:γ グルタミルトランスペプチダーゼ，CK:クレアチンキナーゼ，LIP:リパーゼ，GLU:グルコース T-Cho:総コレステロール，TG:トリグリセリド，PL:リン脂質，NEFA:遊離脂肪酸，TP:総蛋白，ALB:アルブミン，GLB:グロブリン，A/G:アルブミン/グロブリン比，UN:血清尿素窒素，CRE:クレアチニン，T-Bil:総ビリルビン，Ca:カルシウム，Na:ナトリウム，K:カリウム，Cl:クロール

数値は平均（SD）を示す（n=3）.

表 2.7-2　MEND 投与後 24 時間における血液学的検査

| Sample | WBC ($\times 10^3$cells/μL) | RBC ($\times 10^6$cells/μL) | HGB (g/dL) | HCT (%) | MCV (fL) | MCH (pg) | MCHC (g/dL) | PLT ($\times 10^3$cells/μL) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Non treatment | 3.30 (0.14) | 9.57 (0.31) | 14.9 (0.2) | 51.1 (1.0) | 53.4 (0.7) | 15.5 (0.2) | 29.1 (0.2) | 1278 (54) |
| MEND | 0.62 (0.10) | 10.13 (0.39) | 15.6 (0.5) | 52.2 (1.4) | 51.6 (0.8) | 15.4 (0.2) | 29.9 (0.2) | 958 (62) |
| GALA/MEND | 0.99 (0.20) | 10.44 (0.28) | 15.8 (0.5) | 53.7 (1.2) | 51.4 (0.9) | 15.2 (0.4) | 29.5 (0.3) | 1018 (160) |

| Sample | Neut | Lymph | Mono | Eos | Baso | LUC | Retic |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ($\times 10^3$cells/μL) | | | | | | ($\times 10^9$cells/L) |
| Non treatment | 3.30 (0.14) | 9.57 (0.31) | 14.9 (0.2) | 51.1 (1.0) | 53.4 (0.7) | 15.5 (0.2) | 29.1 (0.2) |
| MEND | 0.62 (0.10) | 10.13 (0.39) | 15.6 (0.5) | 52.2 (1.4) | 51.6 (0.8) | 15.4 (0.2) | 29.9 (0.2) |
| GALA/MEND | 0.99 (0.20) | 10.44 (0.28) | 15.8 (0.5) | 53.7 (1.2) | 51.4 (0.9) | 15.2 (0.4) | 29.5 (0.3) |

WBC:白血球，RBC:赤血球，HGB:ヘモグロビン，HCT:ヘマトクリット値，MCV:平均赤血球容積，MCH:平均赤血球ヘモグロビン量，MCHC:平均赤血球ヘモグロビン濃度，PLT:血小板数，Neut:好中球，Lymph:リンパ球，Mono:単球，Eos:好酸球，Baso:好塩基球，LUC:大型非染色球，Retic:網赤血球

数値は平均（SD）を示す（n=3）.

表 2.7-3　MEND 投与後 24 時間における各臓器の病理検査

| | Test group | Control | | | MEND | | | GALA/MEND | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Dose(mg/kg) | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Site/Findings | Animal No. | 0101 | 0102 | 0103 | 0201 | 0202 | 0203 | 0301 | 0302 | 0303 |
| Spleen | | | | | | | | | | |
| Deposit,brown pigment,red pulp | | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| Lung | | | | | | | | | | |
| Noteworthy findings | | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Heart | | | | | | | | | | |
| Noteworthy findings | | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Liver | | | | | | | | | | |
| Decrease,glycogen,hepatocyte | | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| Kidneys | | | | | | | | | | |
| Noteworthy findings | | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Weight change ratio (%) | | | | | | | | | | |
| | | -4 | 1 | 0 | -3 | -2 | 0 | -2 | -4 | -13 |

siCD31 封入 MEND（2 mg siRNA/kg）を C57BL/6N マウスに尾静脈内投与し，24 時間後に脾臓，肺，心臓，肝臓及び腎臓を摘出し，光学顕微鏡標本作製により病理検査を行った．スコアは-，+，++及び+++の 4 段階で評価した．また，各個体の MEND 投与前後における体重変化率を算出した．

## 2.8　IVRTCLSM を用いた MEND の生体内挙動評価

GALA/MEND 単回投与の安全性は確認されたが，GALA/MEND は負電荷を持つ GALA が脂質膜表面に修飾されているものの，脂質膜にカチオン性脂質である DOTMA を用いているため，弱い正電荷を帯びている（+15 mV）．強い正電荷を持つキャリアは血流内で凝集を引き起こすことから，弱いながらも正電荷を持つ GALA/MEND も凝集が懸念された．そこで，マウス耳介静脈内を流れる Cy3 標識 siRNA 封入 MEND 及び GALA/MEND の挙動を IVRTCLSM により直接観察した [45]．観察開始 10sec 後に MEND 及び GALA/MEND を尾静脈留置カテーテルを介して BALB/c ヌードマウス（8 週齢，♀）に投与した．投与後 2.2min における動画の画像を切り出した静止画を図 2.8-1 に示した．MEND 投与時にはマイクロオーダーの様々な大きさの塊が血流内を流れていたが，GALA/MEND は蛍光シグナルが分散している様子が観察された．この凝集の程度は血流内の領域における各ピクセル間の Cy3 蛍光強度の変動係数（C.V.）を算出することにより定量化した（図 2.8-2）[46]．MEND の C.V.値は大きく変動しながら経時的に減少していった．一方で，GALA/MEND の C.V.値は GALA./MEND の血流内への流入に伴い上昇し，その後 C.V.値の変動はほとんどなく，低い値を維持して推移した．

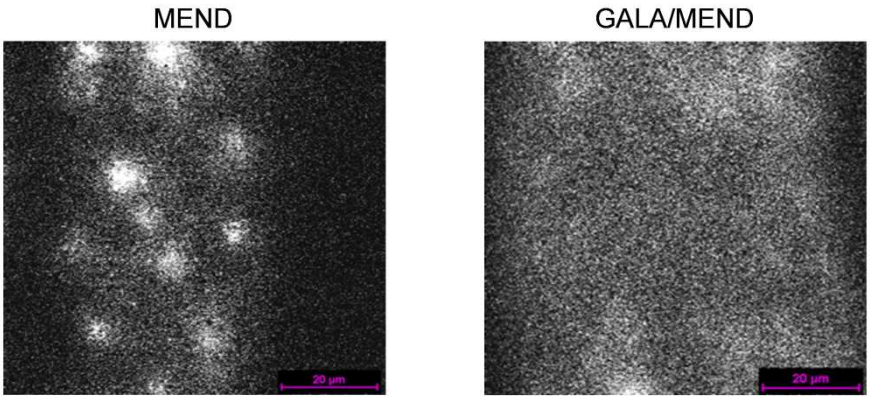



図 2.8-1　マウス耳介静脈血流内における MEND の挙動

Cy3 で蛍光標識した MEND 及び GALA/MEND を BALB/c ヌードマウスの尾静脈より投与し，IVRTCLSM によりマウス耳介静脈血流内を動画で撮影した．図に示す画像は，MEND 及び GALA/MEND 投与後 2.2 分の様子を示している．

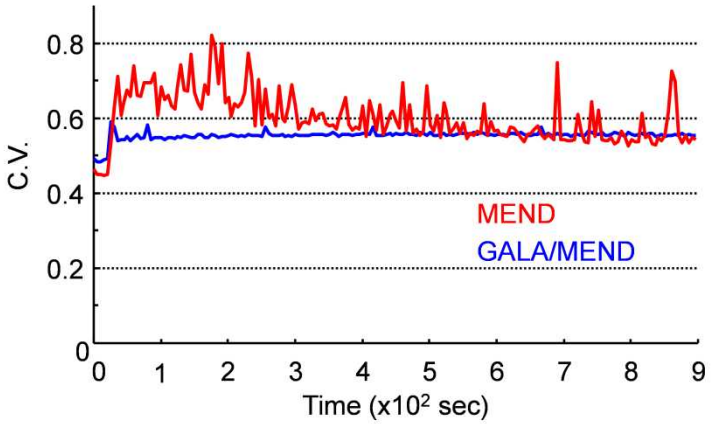



図 2.8-2　C.V.算出によるマウス耳介静脈血流内における MEND の凝集定量評価

凝集の程度は得られた動画から 5 秒毎に抽出した画像中の Cy3 蛍光強度の変動係数（C.V.）を用いて定量化した．C.V.値は血管領域中から抽出した関心領域（ROI）における蛍光強度の標準偏差を平均値で除することにより算出している．算出した C.V.値は 5 秒ごとにプロットした．

次に, MEND 及び GALA/MEND に封入した Cy3 標識 siRNA の肺への集積の様子を観察した．まず，麻酔下で BALB/c ヌードマウス（8 週齢，♀）に人工呼吸器を装着し，胸腔を切開した．次に，肺毛細血管を可視化するため Evans Blue を尾静脈内投与し，その後，Cy3 標識 siRNA 封入 MEND あるいは GALA/MEND（1 mg siRNA/kg）を尾静脈留置カテーテルを介して投与した．なお，マウスの肺毛細血管は IVRTCLSM を用いることにより，組織サンプリングをすることなく直接観察を可能にしている（図 2.8-3）．MEND 投与時において，siRNA は肺の血管壁に集積する際に，マイクロオーダーの大きな凝集を形成して流れていた（Supplemental Movie 4 及び図 2.8-4a）．一方で，GALA/MEND は凝集塊の形成なしに肺毛細血管内を流れており，血管壁に徐々に集積している様子が観察された（Supplemental Movie 5 及び図 2.8-4b）．GALA 修飾による凝集塊の減少は Cy3 蛍光シグナルの C.V.値の計算結果によっても定量的に確認された（図 2.8-5）．MEND の凝集が GALA の修飾により解消されることを示す今回のデータは，MEND に修飾された GALA が粒子表面で負電荷層を形成することによりカチオン性粒子を血球成分から保護していることを示唆している．従って，GALA はエンドソーム脱出及び肺血管内皮細胞ターゲットに加えて，MEND の凝集を抑制する機能も併せ持っていることが示された．

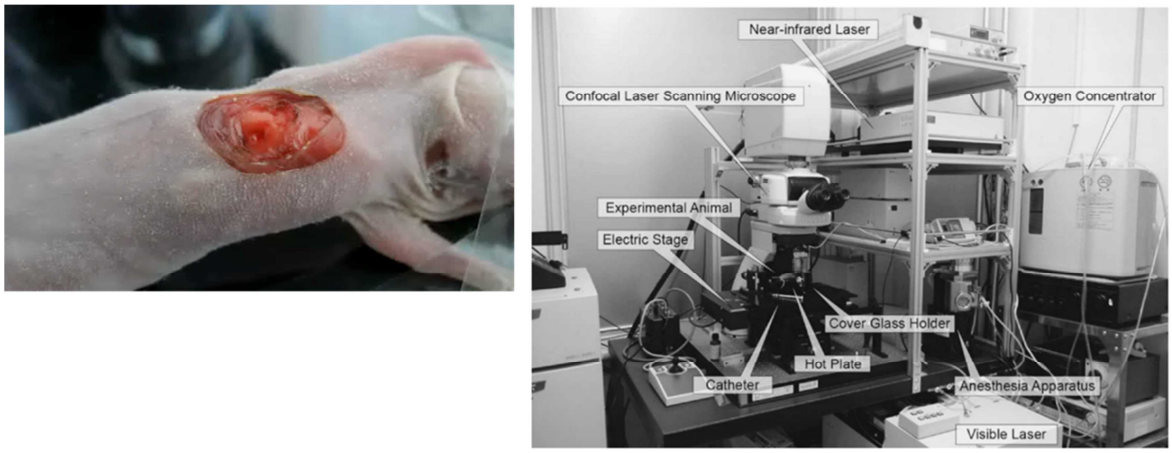



図 2.8-3　IVRTCLSM によるマウス肺血管の観察

麻酔下で BALB/c ヌードマウス（8 週齢，♀）に人工呼吸器を装着し，胸腔を切開し（左図），リアルタイム生体内共焦点レーザー顕微鏡システム（IVRTCLSM）により観察した（右図）[89]．IVRTCLSM は，共焦点レーザー顕微鏡本体と画像解析ワークステーションの他に，実験動物固定器具や実験動物のコンディションを管理するための周辺装置によって構成される．

右図は，Yakugaku Zasshi. 2012;132(12):1347-54.より引用した．

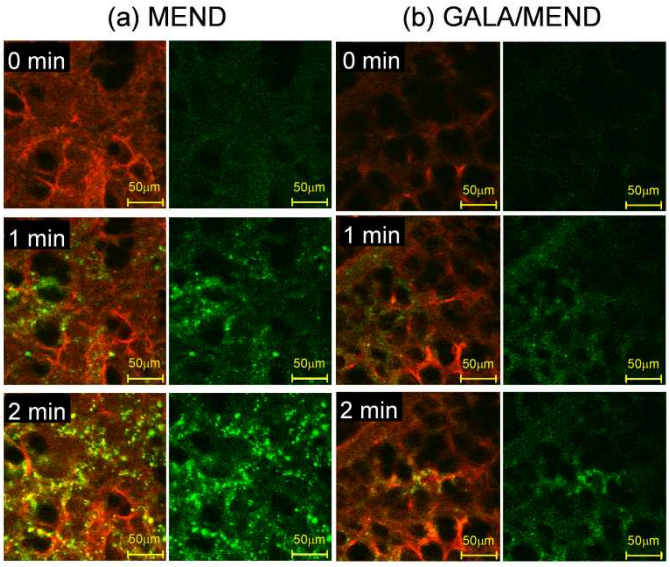



図 2.8-4　マウス肺毛細血管内における MEND の挙動

Cy3 で蛍光標識した MEND 及び GALA/MEND を BALB/c ヌードマウスの尾静脈より投与し，IVRTCLSM によりマウス肺静脈血流内を動画で撮影した．図に示す画像は，MEND 及び GALA/MEND 投与後 0, 1, 2 分後の様子を示している．緑：siRNA（Cy3），赤：血管（EvansBlue）

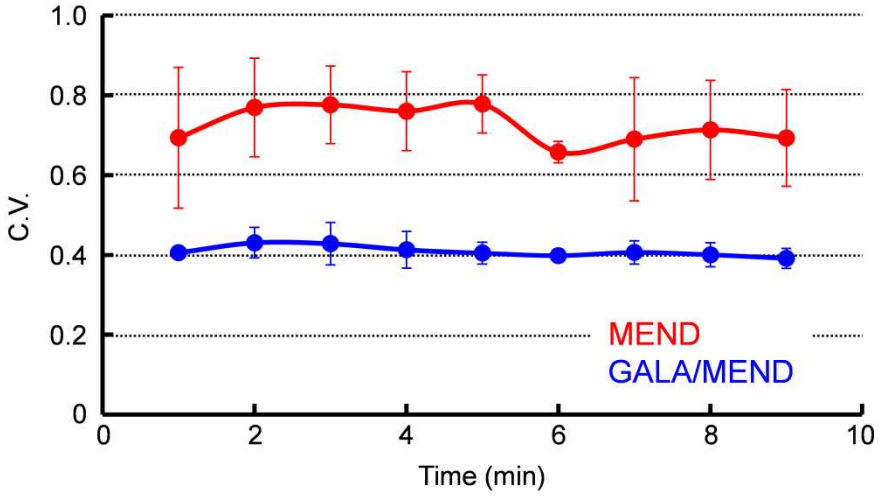



図 2.8-5　C.V.算出によるマウス肺毛細血管内における MEND の凝集定量評価

凝集の程度は得られた動画から 1 分毎に抽出した画像中の 5 箇所における Cy3 蛍光強度の変動係数（C.V.）を算出し定量化した．C.V.値は血管領域中から抽出した関心領域（ROI）における蛍光強度の標準偏差を平均値で除することにより算出している．算出した C.V.値は 5 箇所の ROI の平均値±SD を示している．

## 2.9　siCD31 siRNA 封入 GALA/MEND 投与による肺転移モデルマウスの治療

GALA/MEND の臨床応用の可能性評価として, 抗腫瘍実験を試みた. ターゲット遺伝子として, 既に GALA/MEND によるノックダウンに成功している CD31 を選定した．CD31 は血管内皮細胞のマーカーであると共に，血管内皮細胞の管腔形成に関与していることが報告されている [90]. さらに，CD31 ノックアウトマウスあるいは anti-CD31 抗体を投与したマウスにおいて，腫瘍微小血管の形成が乱れ，進行性メラノーマの転移を抑制できることが報告されている [64]．また，メラノーマの肺転移は予後が悪いことも報告されている [91].

そこで，siCD31 を用いたメラノーマ肺転移の治療を試みた．ルシフェラーゼ（GL4）を安定発現させた B16-F10 メラノーマ細胞（B16-F10-luc2）を C57BL/6N マウスに尾静脈内投与（day 0）することでメラノーマ肺転移モデルマウスを作製した．腫瘍移植後翌日より siCD31 を封入した GALA/MEND（1.0 mg siRNA/kg）を 3 日間隔で 6 回尾静脈内投与した．移植 17 日後，マウスより肺を摘出し, 肺のルッシフェラーゼ活性を測定することにより腫瘍の進行程度を定量化した. また同時に，肺における CD31 mRNA 発現量も定量した.

その結果，siCD31 を封入した GALA/MEND 投与群の腫瘍増殖は，コントロール群（未処置群及び Control siRNA（siGL3）投与群）と比較して約 50%有意に抑制されていた（図 2.9-1b）. この一連の実験において，CD31 の mRNA 発現量は未処置群及び siGL-3 投与群と比較して約 80%以上抑制されていたこと（図 2.9-1a），先述した先行論文において，CD31 ノックアウトマウスの腫瘍増殖が半分程度であったことから [64]，GALA/MEND は CD31 mRNA 発現抑制による薬理効果を十分に発揮したと考えられた.

GALA/MEND 単回投与時には体重減少が見られていたが, この実験における GALA/MEND 投与による体重変化推移は未処置群と同様であった（図 2.9-1c）．臓器回収当日（Day17）に全投与群で体重減少が見られているが，これは腫瘍増殖の進行が要因と推察しており，GALA/MEND 投与の影響はないと考えている．また, Day17 において, 肝障害の指標となる血漿中 AST 及び ALT は siCD31 投与群では基準値付近であった（基準値 AST：43 IU/L，ALT：21 IU/L）ことから，GALA/MEND の繰り返し投与は肝障害を誘導しないことが確認された（図 2.9-1d）．一方で，肝転移のマーカーでもある AST の血清中濃度は肺転移が進行していた未処置群及び siGL3 投与群で上昇が見られ，血清中 AST 濃度は肺転移の進行度と良好な相関性（相関係数：0.71）が見られた（図 2.9-2）．これは，肺転移進行に伴いメラノーマ細胞が肝臓に二次転移したことが要因と考えられ，同時に GALA/MEND 投与は肺から肝臓への 2 次的な転移を抑制した可能性が示唆された.

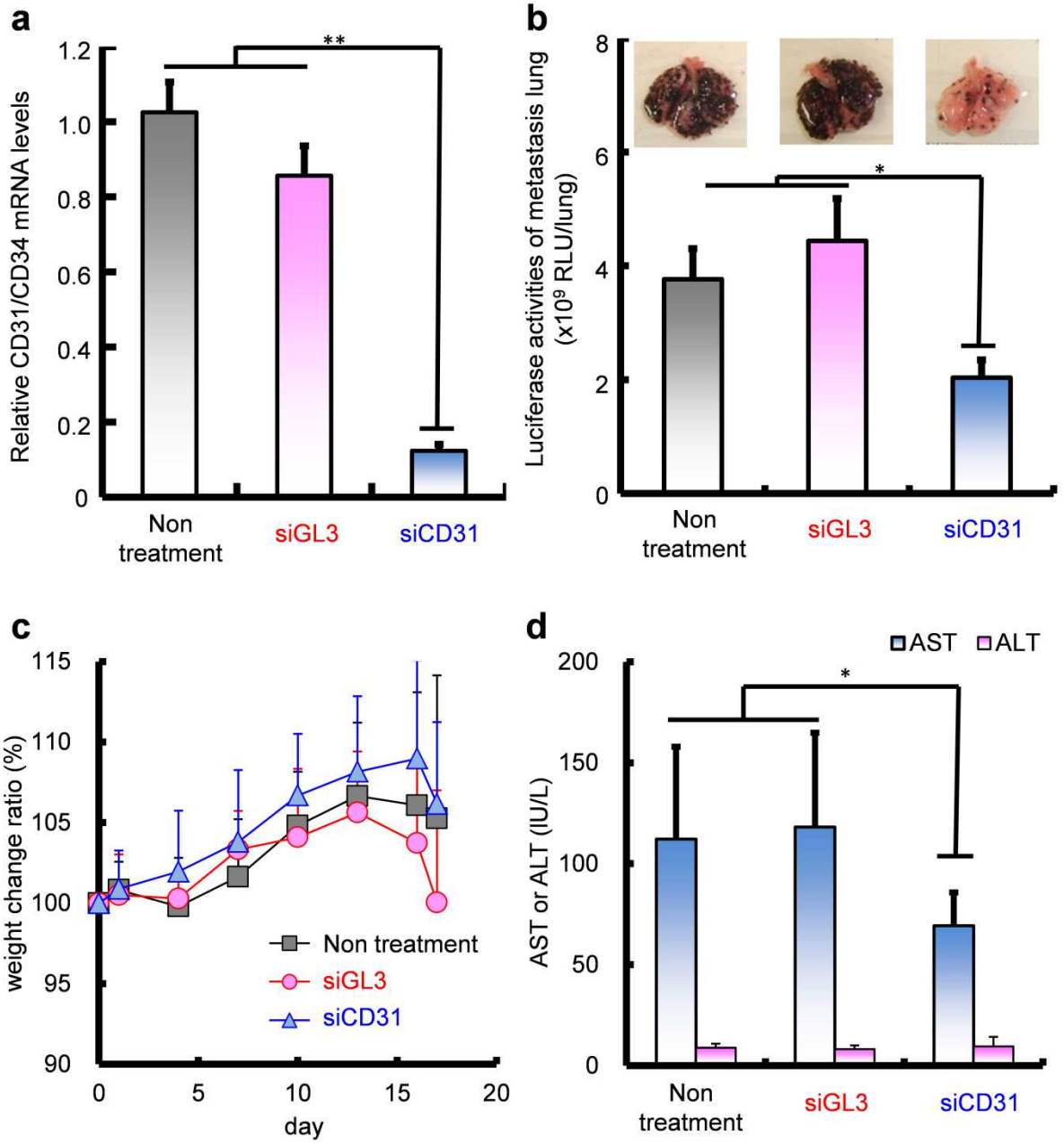



図 2.9-1　GALA/MEND 投与によるメラノーマ肺転移モデルマウスにおける抗腫瘍効果

メラノーマ肺転移モデルマウスは C57BL/6N マウスに 2 x $10^5$ B16F10-luc2 を Day0 に尾静脈内投与し，作製した．siGL3（ネガティブコントロール）あるいは siCD31 を封入した GALA/MEND を投与量 1 mg siRNA/kg でモデルマウスに移植後翌日から 3 日おきに Day16 まで計 6 回尾静脈内投与した．Day0 から Day17 までの体重変化推移（c）を測定し，Day17 にモデルマウスから肺を摘出し，ノックダウン活性（a），肺転移（b）を測定し，血清中 AST 及び ALT（d）を測定した（n=9-10）．（a）ノックダウン活性は，肺より抽出した mRNA 量を qRT-PCR 法により測定した．縦軸は CD31 の mRNA 量を CD34 の mRNA 量で補正した値を示す．（b）肺転移は癌進行の指標として GL4 ルシフェラーゼ活性を測定した．ルシフェラーゼ活性は肺臓器あたりの相対蛍光強度（RLU/lung）として算出した．写真は摘出した肺の各投与群の代表例を示している．（c）体重変化推移は，Day0 の体重を基準として示している．

* : p<0.05，** : p<0.01（vs Non treatment 及び siGL3）

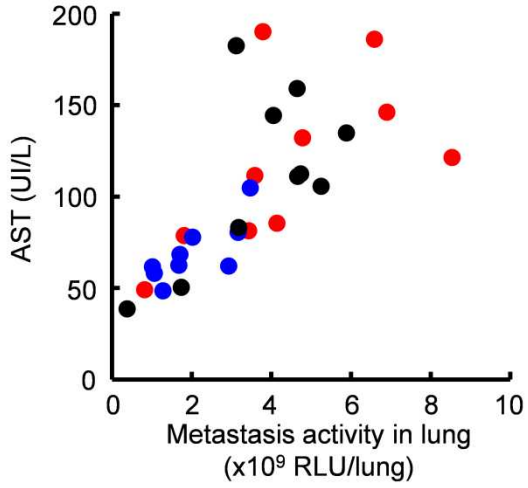



図 2.9-2　肺転移モデルマウスへの GALA/MEND 投与時における肺転移と AST の相関

GALA/MEND 投与によるメラノーマ肺転移モデルマウスの抗腫瘍効果評価時における，マウス個々の肺転移進行度と血清中 AST 値をプロットし，相関図を得た．黒：Non treatment，赤：siGL3，青：siCD31

## 2.10　まとめ

本章では，GALA/MEND の実用化を念頭において，GALA/MEND 組成の最適化検証，安全性評価及び肺転移癌モデルマウスを用いた治療効果について評価を行った. GALA/MEND 組成の最適化検証により，Chol-GALA 修飾量には至適量が存在し，2 mol%修飾時に最も高いノックダウン効果が得られることを明らかにした．また，PEG を含まない GALA/MEND は調製後数日で凝集する問題を抱えていたが，STR-mPEG の修飾はノックダウン効果を低減することなく，この問題を解消し，保存安定性を改善する有用な手段であることを見出した．PEG は GALA/MEND 表面で水和層を形成することから，粒子間の会合が抑制され，粒子が安定化したと考えられた．一方で，PEG による水和層の形成はキャリアの核酸導入効率を著しく低減する PEG のジレンマを誘起する．しかしながら，本検討において PEG のジレンマが見られなかった要因として，静脈内投与時に GALA/MEND が血液により希釈された際に，STR-mPEG 及び C8Cera-mPEG が速やかに GALA/MEND の脂質膜から離脱することで，PEG による細胞内取り込み抑制及びエンドソーム脱出抑制の影響を受けることなく，GALA/MEND が肺に送達されたためと考えられた．

このように最適化された GALA/MEND について，血流内を流れる様子，肺に集積する様子を IVRTCLSM により直接観察した結果，GALA/MEND は凝集塊を形成することなく，分散して血流内を流れ，肺血管内皮細胞に集積していく様子を捉えることができた．一方で，GALA 未修飾 MEND は血管内でマイクロオーダーの凝集を形成していた. GALA はエンドソーム脱出機能に加え，肺血管内皮へのターゲット能を持つだけでなく，凝集を引き起こすキャリアの凝集を防ぐ第 3 の機能も有していることから，GALA はこれまでに報告されているリガンド[92-94]とは一線を画すペプチドであることが示された．

最後に，GALA/MEND が siRNA を薬剤として治療への応用が可能か検証するため，メラノーマ肺転移モデルマウスを用いて治療効果を評価した結果，ナノキャリア投与時に最も懸念される肝毒性，全身毒性の指標となる体重減少なしに，肺転移を抑制することに成功した． 3 日間隔で 17 日間に渡り連続投与しても顕著な毒性は見られなかったこと，単回投与時に血液学的，臓器病理所見において重篤な変化は見られなかったことから, GALA/MEND は薬効と毒性の観点から十分に実用性があると考えられた.

今回は，CD31 をターゲットとして肺転移癌の治療効果を評価したが，肺転移への関与がより高い遺伝子をターゲットとして siRNA を送達することにより，さらに高い治療効果が得られることが期待される．また，GALA/MEND は癌だけでなく，肺血管内皮細胞が深く関与している肺高血圧症，急性肺障害などの疾患への応用も期待でき，今後さらに研究を進めていきたいと考えている.

# 第 3 章

# siRNA 封入 GALA/MEND 調製における
# エタノール希釈法の有用性評価

# 第3章. siRNA 封入 GALA/MEND 調製におけるエタノール希釈法の有用性評価

## 3.1 緒言

第 2 章では，GALA/MEND の薬理効果及び安全性に着目して検討を進めてきたが，その調製方法は単純水和法を採用していた．単純水和法による調製は，まず，エタノールに溶解した脂質をガラスチューブ中に添加し，減圧下でエタノールを除去することで脂質フィルムを作製する．次に，脂質フィルムに siRNA と PEI から成るコア水溶液を添加し，水和，超音波処理することで GALA/MEND を調製している（図 3.1-1）．単純水和法は，リポソームの調製法として 1965 年に Bangham が報告し [95]，ラボにおける基礎実験では，今も一般的に用いられている手法であり，MEND の調製方法としても実績が豊富である [31, 33, 96, 97]．しかしながら，単純水和法は製造のスケールアップが課題として挙げられる製法であり，脂質薄膜調製時におけるフラスコ容積に制限があること，脂質水和時における超音波照射エネルギーの不均一性がその要因となっている [98]．GALA/MEND の実用性を考える上で，製造のスケールアップは克服すべき課題であり，製法の変更が必要と考えた．

これまでに様々なリポソーム調製方法が開発されているが，実用性を考える上でそれぞれ問題を抱えており，各製法の利点・欠点を表 3.1-1 にまとめた．これら製法の中で，スケールアップが容易であり，特殊な機器を用いずに調製でき，かつ核酸封入リポソームの調製法としても報告されているエタノール希釈法に着目し [99-101]，エタノール希釈法に基づいた GALA/MEND の調製を試みた．

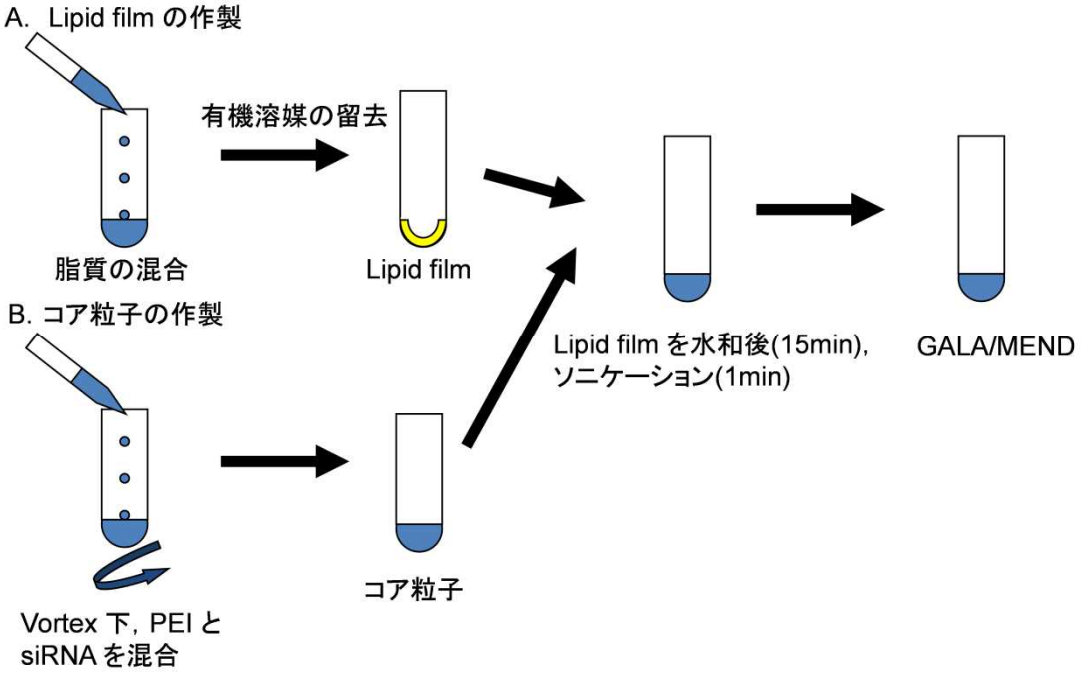



図 3.1-1　単純水和法による MEND の調製方法

単純水和法による調製は，まず，エタノールに溶解した脂質をガラスチューブ中に添加し，減圧下でエタノールを除去することで脂質フィルムを作製する．次に，脂質フィルムに siRNA と PEI から成るコア水溶液を添加し，水和，超音波処理することで GALA/MEND を調製している．

表 3.1-1　各種リポソーム調製法の特徴

| リポソーム調製法 | 利点 | 欠点 |
|---|---|---|
| 単純水和法 | プロセスが単純<br>残留溶媒が少ない | スケールアップが困難<br>膜枚数が不均一 |
| エタノール注入（希釈）法 | スケールアップが容易<br>均一な一枚膜リポソームが形成 | エタノールの残留 |
| 界面活性剤除去法 | プロセスが単純<br>粒子サイズのコントロールが可能<br>均一な一枚膜リポソームが形成 | 界面活性剤の残留 |
| REV 法 | 高い封入効率が得られる | 有機溶媒の残留<br>変性・分解しやすい分子には適さない |
| 超臨界二酸化炭素法 | 有機溶媒を使用しない<br>スケールアップが容易<br>粒子サイズのコントロールが可能 | 高圧に耐える特殊な装置が必要<br>収率が低い |

## 3.2　エタノール希釈法による GALA/MEND の調製

調製方法の検討は，第 2 章で最適化を確認した組成（DOTMA/Chol/EPC/STR-mPEG/Chol-GALA = 30/40/30/5/2）を用いて実施した．エタノール希釈法による MEND の調製は，まず，ボルテックス下で脂質を含むエタノール溶液に siRNA/PEI コア水溶液を滴下し，エタノール濃度を 30%とすることで，siRNA/PEI コアと脂質の複合体を形成させる．ここに，10mM HEPES buffer 5% glucose 溶液（HBG）を一気に加えてエタノールを希釈し，脂質の溶解度を下げることで脂質膜が形成されると共にコア粒子が脂質膜内に封入され，MEND が形成される．最後に，溶液中のエタノールの除去及び MEND の濃縮を目的として，限外ろ過を行うことで，実験に供する MEND を得た（図 3.2-1）．なお，コントロールとして，GALA 未修飾の MEND も同様に調製した．

従来の単純水和法及びエタノール希釈法により調製した MEND の物性データを表 3.2-1 に示した．GALA 未修飾時における単純水和法調製 MEND（$MEND_{Hyd}$）とエタノール希釈法調製 MEND（$MEND_{EtOH}$）の粒子サイズ及び ζ 電位は調製法に関わらず同程度であった．一方で，GALA/MEND において，エタノール希釈法調製品（$GALA/MEND_{EtOH}$）の粒子サイズは約 150 nm と従来の水和法調製品（$GALA/MEND_{Hyd}$）の粒子サイズ（約 100 nm）と比較して大きくなることが示された．なお，GALA/MEND の ζ 電位は調製法に関わらず約 20 mV と同程度であり，負電荷を持つ GALA の修飾により ζ 電位は MEND と比較して減少していた．

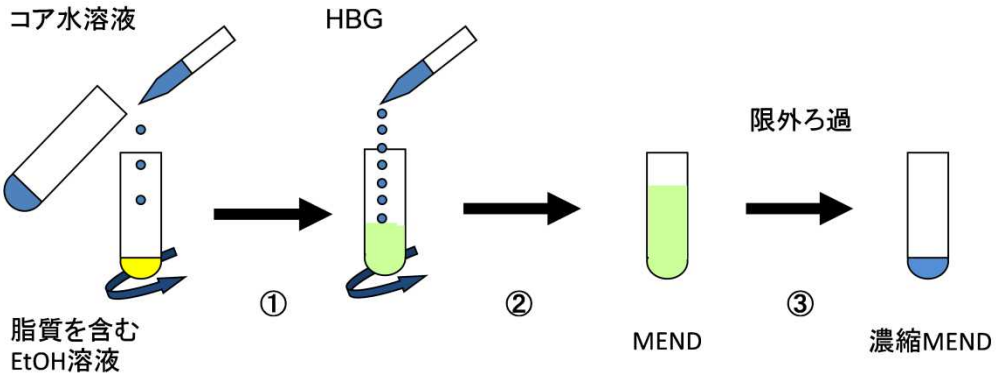



図 3.2-1　エタノール希釈法による MEND の調製方法

エタノール希釈法による MEND 調製法は，①ボルテックス下で脂質を含むエタノール溶液に siRNA/PEI コア水溶液を滴下し，エタノール濃度を 30%とすることで，siRNA コアと脂質の複合体を形成させる．②ここに 10mM HEPES buffer5% glucose 溶液（HBG）を一気に加えてエタノールを希釈して MEND を調製し，③限外ろ過によりエタノールの除去及び MEND の濃縮を行う．

表 3.2-1　各製法により調製された MEND の粒子径及びζ電位

| | Size (nm) | PDI | ξ-potential (mV) |
|---|---|---|---|
| $MEND_{Hyd}$ | 148±5 | 0.222±0.016 | 29±2 |
| $MEND_{EtOH}$ | 150±13 | 0.217±0.037 | 35±4 |
| $GALA/MEND_{Hyd}$ | 103±11 | 0.264±0.009 | 22±2 |
| $GALA/MEND_{EtOH}$ | 145±8 | 0.257±0.030 | 20±6 |

## 3.3　エタノール希釈法により調製した GALA/MEND の機能評価

各製法により調製した MEND のノックダウン効果は血管内皮細胞特異的に発現している CD31 を標的として評価した. siCD31 用量が 0.05-4 mg siRNA/kg となるように調製した MEND を C57BL/6N マウス（6 週齢，♂）の尾静脈より投与し，24 時間後に肺を摘出した．摘出した肺から mRNA を抽出し，CD34 に対する CD31 mRNA の相対発現量を qRT-PCR 法により解析した. 縦軸に CD34 に対する CD31 mRNA の相対発現量を, 横軸に投与量をとることで, 各 MEND のノックダウン効果用量反応曲線を作成した（図 3.3-1）．その結果，MEND は調製法に関わらず同程度のノックダウン効果であった（ED50 ; 約 1.5 mg siRNA/kg）．次に，単純水和法において，GALA 修飾は第 2 章で報告した通り，MEND のノックダウン効果を大きく改善した（ED50 ; 約 0.34 mg siRNA/kg）．エタノール希釈法においても同様に GALA 修飾により MEND のノックダウン効果が大きく改善されることが確認され，さらに $GALA/MEND_{EtOH}$（ED50 ; 約 0.17 mg siRNA/kg）は $GALA/MEND_{Hyd}$ より低い ED50 を持つ傾向が示された．この結果より，エタノール希釈法は MEND に修飾した GALA の機能に予期せぬ影響を及ぼしている可能性が示唆された.

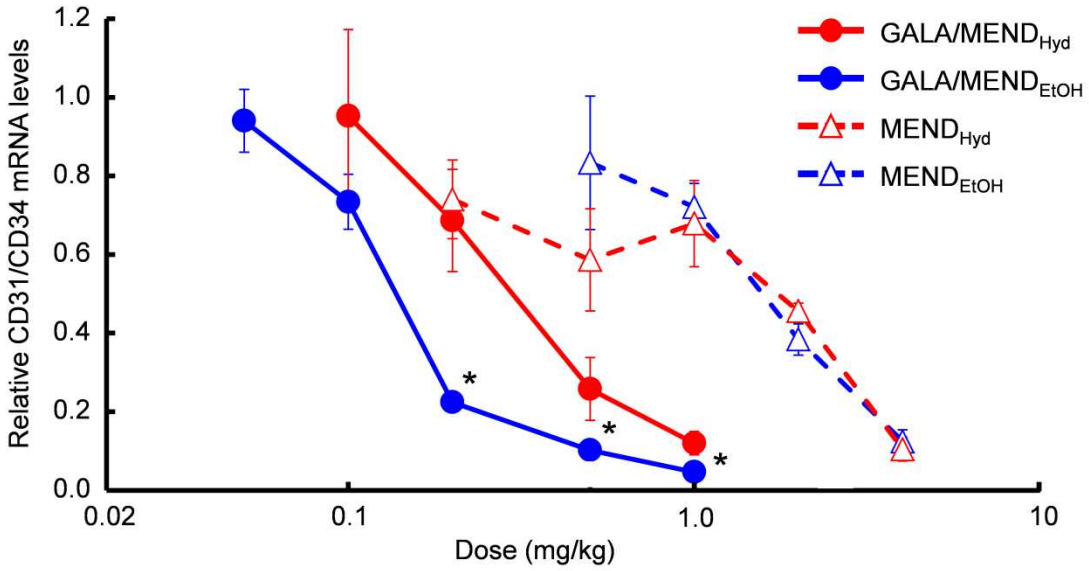



図 3.3-1　各製法により調製された MEND の肺血管内皮細胞ノックダウン効果

単純水和法及びエタノール希釈法により調製した siCD31 封入 MEND（$MEND_{Hyd}$，$MEND_{EtOH}$）を 0.05-4.0 mg siRNA/kg の投与量で C57BL/6N マウスに尾静脈内投与し，24 時間後に肺を摘出し，mRNA 量を qRT-PCR 法により測定した（n=3）．縦軸は CD31 の mRNA 量を CD34 の mRNA 量で補正した値を示す．

* : $p < 0.01$ (vs 各 dose の GALA/$MEND_{Hyd}$)

## 3.4　調製法が体内動態に及ぼす影響評価

エタノール希釈法による調製がノックダウン効果を増強した要因として，体内動態に着目し，評価を行った．MEND の脂質を[$^{3}$H]Cholesteryl hexadecyl ether ([$^{3}$H]CHE)により標識し，siRNA を[γ-$^{32}$P]-adenosine 5′-triphosphate (ATP)により標識し([$^{32}$P]siRNA)，siRNA 用量が 2 mg/kg となるように調製した MEND を ICR マウス（5 週齢，♂）の尾静脈から投与し，1 時間後における組織分布及び血中滞留性を測定した(図 3.4-1)．GALA/MEND$_{Hyd}$ の脂質及び siRNA は MEND$_{Hyd}$ と比較して肺に多く集積し，リポソームのクリアランス臓器である肝臓及び脾臓への集積は大きく抑制された．一方で，GALA/MEND$_{Hyd}$ と GALA/MEND$_{EtOH}$ の脂質及び siRNA の各臓器への集積は，今回評価した全ての臓器において同様の結果を示した．次に，GALA/MEND への siRNA の封入率に着目した．MEND に封入されていない naked siRNA は血中から速やかに消失することから，血中の[$^{32}$P]siRNA 量を[$^{3}$H]CHE 量で除することで，GALA/MEND への siRNA の封入率を算出することができる．その結果，封入率は調製法に関わらず約 70%であった．これらの結果より，GALA/MEND$_{EtOH}$ のノックダウン効果改善は，体内動態及び siRNA の封入効率では説明できないことが示された．

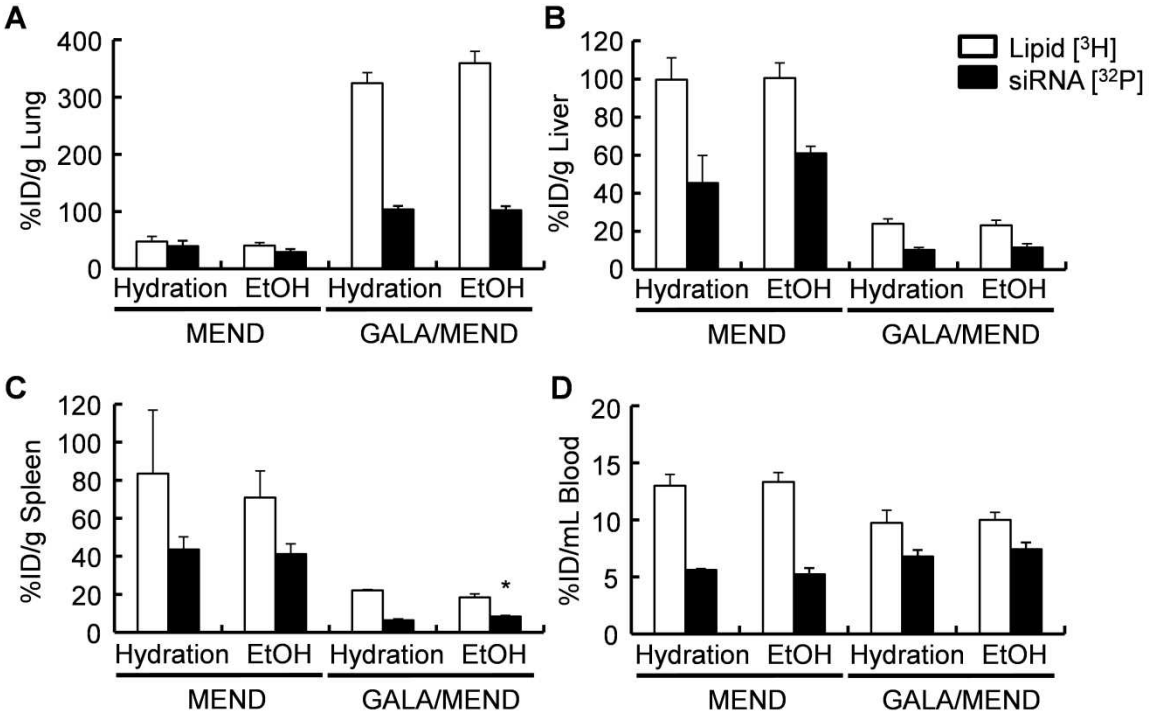



図 3.4-1　投与 1 時間後における MEND の体内分布（A:肺，B:肝臓，C:脾臓，D:血液）

脂質を[$^{3}$H]CHE，siRNA を[$^{32}$P]siRNA で標識した MEND（2 mg siRNA/kg）をマウス尾静脈より投与し，1 時間後の肺，肝臓，脾臓及び血液中における[$^{3}$H]及び[$^{32}$P]カウントを測定した．各臓器移行量は，投与量に対する組織 1g（血液は 1 mL）あたりの移行量として算出した（%ID/g tissue, mean ± S.D., n = 3)．

* : p< 0.05（vs Hydration）

## 3.5　調製法が細胞内動態に及ぼす影響評価

siRNAによるノックダウン活性は細胞内取り込み及びエンドソーム脱出を含む細胞内動態が律速になることが知られている[102]．図 3.4-1 の結果より，肺集積から細胞内取り込みまでの過程に違いはないと考え，GALA/MEND$_{Hyd}$ と GALA/MEND$_{EtOH}$ のエンドソーム脱出過程を評価した．調製に用いるsiRNAの一部をCy5標識siRNAと置換することにより蛍光標識したGALA/MENDを HeLa 細胞に添加し，6 時間後におけるエンドソーム脱出を共焦点レーザー顕微鏡（CLSM）により観察した．その結果，GALA/MEND$_{EtOH}$ は後期エンドソームと共局在していない赤のドットが多く観察された（図 3.5-1）．一方で，GALA/MEND$_{Hyd}$ は GALA/MEND$_{EtOH}$ と比較して，細胞内の赤のシグナルが明らかに少なくなっていた．この要因として，GALA/MEND$_{Hyd}$ はエンドソーム/リソソーム内で速やかに分解されている可能性を考えた．そこで，この画像を解析し，1 細胞中における GALA/MEND のエンドソーム脱出の割合を算出し，20 個の細胞の結果をプロットしたグラフを図 3.5-1c に示した．その結果，GALA/MEND$_{Hyd}$ のエンドソーム脱出効率は，GALA/MEND$_{EtOH}$ より有意に低かった．調製法の違いが，このような機能の差を生んだメカニズムは不明であるが，GALA/MEND$_{EtOH}$ は GALA/MEND$_{Hyd}$ と比較して粒子サイズが大きいことから，エンドソーム膜と相互作用する 1 粒子中の GALA 分子の数が多くなり，エンドソーム脱出が促進された可能性が推察された．これらの結果より，GALA/MEND$_{EtOH}$ のノックダウン活性の増強は，エンドソーム脱出の促進が要因と考えられた．

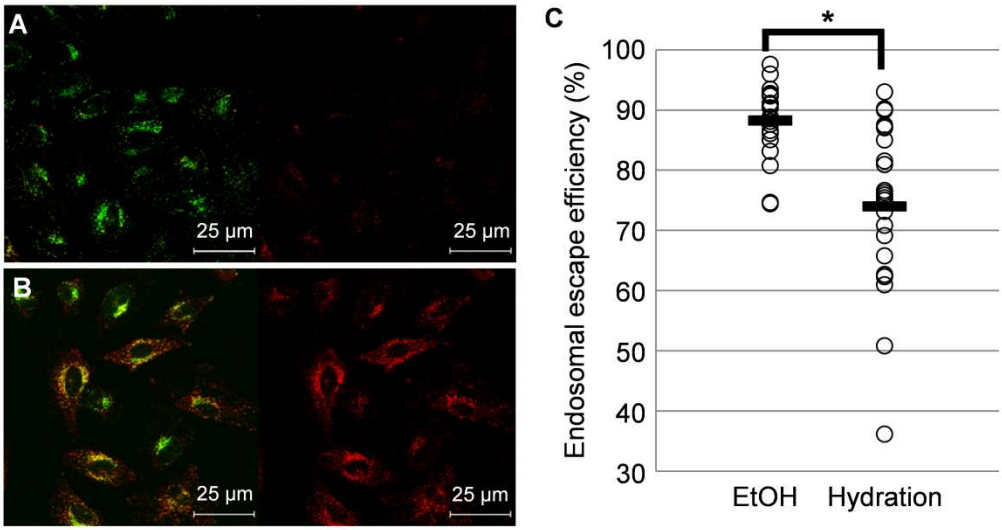



図 3.5-1　HeLa 細胞における GALA/MEND の細胞内動態評価

GALA/MEND は調製に用いる siRNA の一部を Cy5 標識 siRNA と置換することにより蛍光標識した．単純水和法により調製した GALA/MEND（A）あるいはエタノール希釈法により調製した GALA/MEND（B）を HeLa 細胞に添加し，6 時間後に CLSM により観察した．エンドソーム/リソソームと細胞質に存在する siRNA を区別するために，エンドソーム/リソソームは Lysotracker Blue を用いて染色した．Lysotracker Blue と Cy5 蛍光シグナルは，それぞれ緑と赤の疑似カラーで示した．（C）1 細胞中における $GALA/MEND_{EtOH}$ と $GALA/MEND_{Hyd}$ のエンドソーム脱出の割合を算出し，20 個の細胞の結果をプロットし，定量化した．

*; $p < 0.01$，Mann-Whitney U-test

## 3.6　まとめ

本章では，GALA/MEND は製造のスケールアップが比較的容易であるエタノール希釈法により調製可能であることを明らかにした．さらに，粒子サイズの大きい $GALA/MEND_{EtOH}$ は速やかな細胞内取り込み及びエンドソーム脱出により，$GALA/MEND_{Hyd}$ と同程度以上の高いノックダウン効果を得られることが示された．今回，検討したエタノール希釈法はチューブを用いたバッチ方式であり，単純にスケールアップすることは難しい．特に，siRNA コアの調製をスケールアップあるいは連続的に製造することは困難が予想される．しかしながら，マイクロ流路を用いた連続調製はエタノール希釈法の調製原理を応用可能であり [103, 104]，原理的には siRNA コアの調製も可能と考えている．従って，エタノール希釈法は GALA/MEND の大量製造及び siRNA の肺送達キャリアとしての機能改善の可能性を持つ調製方法として期待できると考えている．

# 第 4 章（Appendix）

# PEG 脂質のアンカー構造が pDNA 封入 MEND の細胞内動態に及ぼす影響

# 第4章. PEG 脂質のアンカー構造が pDNA 封入 MEND の細胞内動態に及ぼす影響（Appendix）

## 4.1 緒言

pDNA 送達による遺伝子治療を成功させるためには，細胞が持つ様々なバリアを突破する必要がある [102]．細胞膜/エンドソーム膜は *in vitro* 遺伝子送達における第 1 関門となる．カチオン性リポソームは，負電荷を持つ pDNA と静電気的相互作用により複合体を形成すること，プロテオグリカンなどの存在により負に帯電している細胞膜との結合を容易にすることから，*in vitro* 遺伝子送達システムとして有用であることが報告されている [105-107]．

これまでに，原島研究室では，pDNA とポリカチオンの凝縮化コアを脂質膜で覆った MEND も開発している [29, 32]．pDNA の凝縮化剤として，精子核に特異的に存在する塩基性タンパク質である protamine[108] を用いて負の表面電荷を有する DNA コアを調製し，脂質膜として DOTAP/1,2-dioleoyl-sn-glycero-3- phospho-ethanolamine (DOPE) /Chol を用いた MEND は *in vitro* 培養細胞への高いトランスフェクション活性を持つことが報告されている [32]．また，PEG はリポソームによる低分子薬物, 遺伝子送達において, 水溶性高分子として幅広く用いられている [32, 109-111]．MEND 表面への PEG の修飾は粒子サイズの低下，凝集抑制に寄与することが知られており [44]，これは本稿 2.5 でも述べている．さらに，リポソームへの PEG 修飾はリポソームの生体内安定性を改善し，細網内皮系への捕捉回避による血中滞留性の向上をもたらすことが知られている [111]．PEG はリポソームにこのような有用性を付与する一方で，細胞内取り込み及びエンドソーム脱出を妨げることにより，PEG 化リポソームの遺伝子発現活性を著しく低下させることが明らかとなっている [32, 112]．

本章では，この PEG のジレンマを克服することを目的として，1) エンドソーム脱出を促進する機能性ペプチドの修飾，2) PEG 脂質の脂質構造に着目して検討を行った．エンドソーム脱出素子として，膜融合非依存的にエンドソーム膜破壊機能を持つ INF7 ペプチド [53] を用いた．INF7 は HA2 の膜融合ドメインを一部改変したペプチド（GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYG）であり [54]，中性条件下ではランダムコイル構造をとり，エンドソーム内の酸性条件下で膜破壊機能を持つ α-ヘリックス構造へと変化するペプチドである．PEG 脂質として，最も汎用されている distearoyl-sn-glycero-3-phoshoethanolamine-N-[methoxy (polyethylene glycol)-2000]（DSPE-mPEG）の他に N-octanoyl-sphingosine-1-{succinyl [methoxy (polyethylene glycol) 2000]}(C8Cera-mPEG)，N-palmitoyl-sphingosine-1-{succinyl [methoxy (polyethylene glycol) 2000]}（C16Cera-mPEG）[88]，Cholesterol-polyethylene glycol 2000 （Chol-mPEG） [76] 及び Stearyl-polyethylene glycol 2000（STR-mPEG）を用いた（図 4.1-1）．

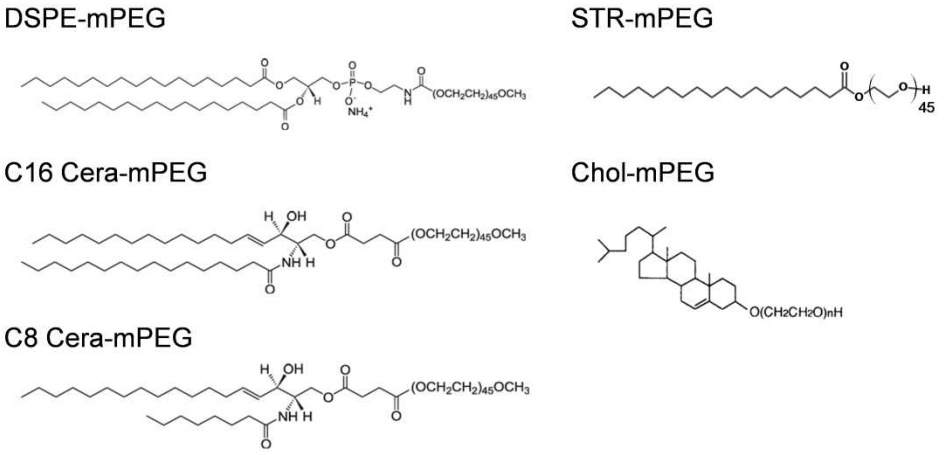



図 4.1-1　検討に使用した PEG 脂質の構造

Distearoyl-sn-glycero-3-phoshoethanolamine-N-[methoxy (polyethylene glycol)-2000] （ DSPE-mPEG ），N-palmitoyl-sphingosine-1-{succinyl [methoxy (polyethylene glycol) 2000]} （ C16Cera-mPEG ），N-octanoyl-sphingosine-1-{succinyl [methoxy (polyethylene glycol) 2000]} （ C8Cera-mPEG ），Cholesterol-polyethylene glycol 2000（Chol-mPEG），Stearyl-polyethylene glycol 2000（STR-mPEG）

## 4.2　MEND の調製

各種 PEG 脂質を用いて調製した MEND の物性を評価した．pDNA の凝縮化剤として，protamine を用いて調製した DNA コアは，粒子径が約 100 nm，ζ電位は-20 mV であった．この時，pDNA に対して電荷比（N/P 比）が 1.0 となるように protamine を添加した．このコアを DOTAP/Chol/EPC/PEG-lipid（30/40/30/5）から構成される脂質膜で覆った MEND，これに 3 mol%の stearylated INF7（STR-INF7）を修飾した INF/MEND を調製した．調製した MEND の粒子径及びζ電位を表 4.2-1 に示した．PEG 脂質未修飾の INF/MEND は明らかな凝集塊を形成し，MEND を調製できなかった．しかしながら，PEG 脂質修飾により INF/MEND の凝集が抑制され，いずれの PEG 脂質を用いた MEND も約 150 nm の均一な粒子が調製できた．また，今回調製した MEND は，脂質膜としてカチオン性脂質を用いていることから，すべて正に帯電していることが確認された. しかしながら, PEG 修飾 MEND は PEG 未修飾 MEND と比較して，ζ電位の低下が見られた．これは，PEG が MEND の脂質膜表面で水和層を形成し，脂質膜表面の正電荷をマスクしているためと考えられた.

表 4.2-1　MEND の粒子径及びζ電位

| MEND | Diameter (nm) | | PDI | | zeta-potential (mV) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | non | INF | non | INF | non | INF |
| MEND | 155 | agg* | 0.207 | agg* | 51 | agg* |
| $MEND_{DSPE\text{-}PEG}$ | 128 | 129 | 0.179 | 0.203 | 25 | 11 |
| $MEND_{C16Cera\text{-}PEG}$ | 136 | 170 | 0.212 | 0.212 | 28 | 18 |
| $MEND_{C8Cera\text{-}PEG}$ | 140 | 146 | 0.237 | 0.218 | 34 | 17 |
| $MEND_{STR\text{-}PEG}$ | 143 | 150 | 0.192 | 0.205 | 39 | 25 |
| $MEND_{chol\text{-}PEG}$ | 138 | 139 | 0.271 | 0.217 | 38 | 24 |

## 4.3　PEG 脂質及び STR-INF7 修飾 MEND の細胞内動態評価

4.2 にて調製した MEND を用いて，PEG 脂質及び STR-INF7 修飾が遺伝子発現活性に及ぼす影響を評価した．ルッシフェラーゼ遺伝子をコードした pDNA を封入した MEND をマウス胎児肺間葉細胞（MFLM-4）に添加し，24 時間後のルッシフェラーゼ活性を測定した．その結果，STR-INF7 未修飾 MEND は PEG 脂質の修飾により著しく遺伝子発現活性が低下した（図 4.3-1a）．この低下は，PEG 脂質の種類によらず確認され，特に DSPE-mPEG 修飾 MEND（$MEND_{DSPE\text{-}PEG}$），C16Cera-mPEG 修飾 MEND（$MEND_{C16Cera\text{-}PEG}$）及び Chol-mPEG 修飾 MEND（$MEND_{Chol\text{-}PEG}$）おいて顕著であった．脂肪鎖が短い C8Cera-mPEG 修飾 MEND（$MEND_{C8Cera\text{-}PEG}$）及び 1 本鎖脂質構造を持つ STR-mPEG 修飾 MEND（$MEND_{STR\text{-}PEG}$）は PEG 脂質修飾の影響が比較的小さかった．この要因として，これら PEG 脂質は脂肪鎖長が短いあるいは脂肪鎖が 1 本しか存在しないために脂質膜との疎水的結合力が低く，MEND を細胞に添加した際，培養液により希釈され，PEG 脂質が MEND から徐々に脱離したためと考えられた [88]．

INF/MEND について，PEG 脂質の修飾により減少した遺伝子発現活性は STR-INF7 の修飾により改善された（図 4.3-1a）．しかしながら，その改善効果は PEG 脂質の脂質構造の違いにより大きく異なっていた．それぞれの PEG 脂質修飾 MEND について，INF/MEND の活性を MEND の活性で除することにより，STR-INF7 修飾による遺伝子発現活性の改善効果を算出した結果を図 4.3-1b に示した．$MEND_{C8Cera\text{-}PEG}$ 及び $MEND_{STR\text{-}PEG}$ について，PEG 修飾による MEND の遺伝子発現活性の低下は限定的であり，STR-INF7 修飾による改善効果は約 30 倍であった．一方，$MEND_{DSPE\text{-}PEG}$ 及び $MEND_{C16Cera\text{-}PEG}$ では，10 倍以内の改善効果しか得られなかった．STR-INF7 はスペーサーとして PEG を持たないため，ペプチドが脂質膜表面の近傍に提示されている．そのため，STR-INF7 のペプチド部位は PEG の水和層に覆われていると考えられる．よって，PEG 脂質が脂質膜に安定して固定される $MEND_{DSPE\text{-}PEG}$ 及び $MEND_{C16Cera\text{-}PEG}$ は STR-INF7 の機能が抑制され，一方で，$MEND_{C8Cera\text{-}PEG}$ 及び $MEND_{STR\text{-}PEG}$ は PEG 脂質が脂質膜から徐々に脱離するために STR-INF7 が機能したと考えられた．これら 4 つの PEG 脂質についてはある程度想定される結果であったが，$MEND_{Chol\text{-}PEG}$ は他の PEG 脂質と異なる傾向を示した．$MEND_{Chol\text{-}PEG}$ は，$MEND_{DSPE\text{-}PEG}$ 及び $MEND_{C16Cera\text{-}PEG}$ と同様に PEG 脂質の修飾により遺伝子発現活性が著し

く低下したにも関わらず，STR-INF7 の修飾により PEG 未修飾 MEND（$MEND_{nonPEG}$）と同程度まで活性が改善し，その改善効果は 100 倍以上であった．なお，一連の実験において，MEND トランスフェクション後に 1 ウェル中のタンパク量を定量することにより試験前後の細胞生存率を評価した結果，未処置群と比較していずれの MEND 処置時にも 80%以上であったことから，MEND による細胞毒性はないことを確認している（図 4.3-2）．

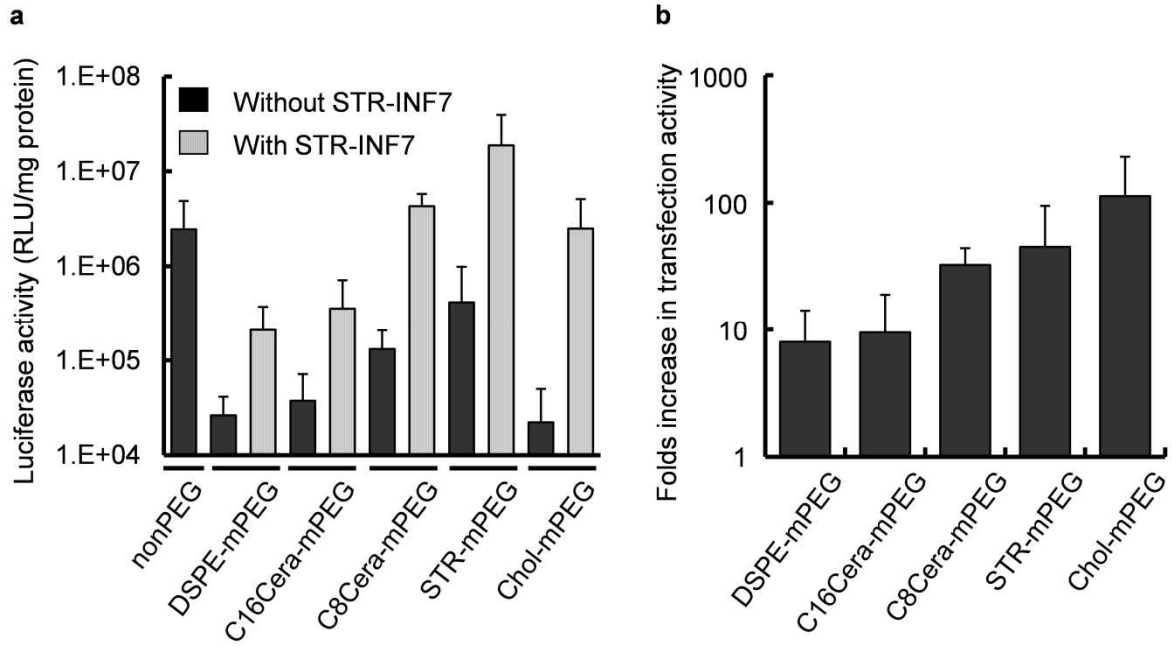



図 4.3-1　MEND の遺伝子発現活性に及ぼす STR-INF7 の影響評価

MEND のルッシフェラーゼ活性（a）．ルッシフェラーゼ遺伝子をコードした pDNA を DOTAP/Chol/EPC から構成される MEND に封入した. 5 mol% PEG 脂質と 3 mol% STR-INF7 を修飾した MEND を MFLM-4 細胞に添加し，24 時間後のルッシフェラーゼ活性を測定した（n=3）．MEND のルシフェラーゼ活性はタンパク質量当たりの相対蛍光強度（RLU/mg protein）として算出した．STR-INF7 による MEND の遺伝子発現活性改善率（b）．MEND の改善率は INF/MEND の活性を MEND の活性で除することで算出した.

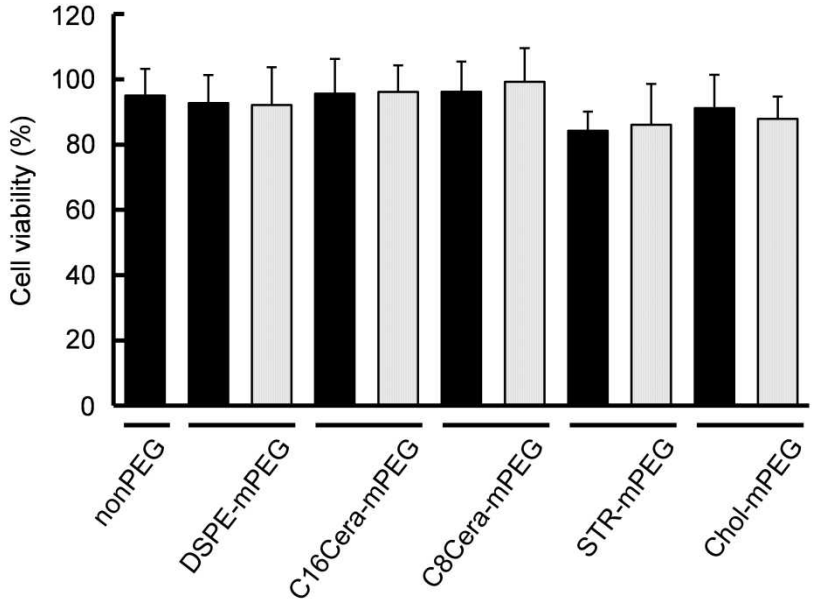



図 4.3-2　MEND トランスフェクション時における細胞生存率

MFLM-4 細胞への MEND トランスフェクション後のタンパク量を定量することにより細胞生存率を評価した．細胞生存率は，MEND 処置時におけるタンパク量を MEND 未処置時におけるタンパク量で除することで算出した（n=3）．

## 4.4　PEG 脂質修飾 MEND の細胞内動態評価

$MEND_{Chol\text{-}PEG}$ は STR-INF7 修飾により著しい遺伝子発現活性の改善が見られたことから，その改善効果メカニズムの解明を目的として，エンドソーム脱出を評価した．QD705 によりラベル化した pDNA 封入 MEND を MFLM4 細胞に添加し，3 時間後に Lysotracker Blue によりエンドソーム/リソソームを染色後，共焦点レーザー顕微鏡（CLSM）を用いて MEND の細胞内動態を観察した（図 4.4-1）．その結果，pDNA の細胞内取り込みは STR-INF7 修飾の有無に関わらず観察されたが，その局在は大きく異なっていた．PEG 未修飾 MEND（$MEND_{nonPEG}$）において，pDNA（赤）単独のドットが多く観察され，エンドソーム/リソソーム（緑）との局在はほとんど見られなかった．一方で，$MEND_{DSPE\text{-}PEG}$ 及び $MEND_{chol\text{-}PEG}$ は，pDNA がエンドソーム/リソソームとほとんど共局在し（黄），pDNA 単独のドットは僅かであった．この結果より，DSPE-mPEG 及び Chol-mPEG は MEND の細胞内取り込みではなく，エンドソーム脱出過程を阻害していることが示唆された．エンドソーム脱出が抑制された $MEND_{DSPE\text{-}PEG}$ に STR-INF7 を修飾しても pDNA はエンドソーム/リソソーム内に留まっていたが，$MEND_{chol\text{-}PEG}$ は STR-INF7 の修飾により pDNA 単独のドットが多く観察された．この結果より，STR-INF7 修飾時における $MEND_{DSPE\text{-}PEG}$ と $MEND_{chol\text{-}PEG}$ の遺伝子発現改善効果の違いは，エンドソーム脱出にあることが明らかとなった．

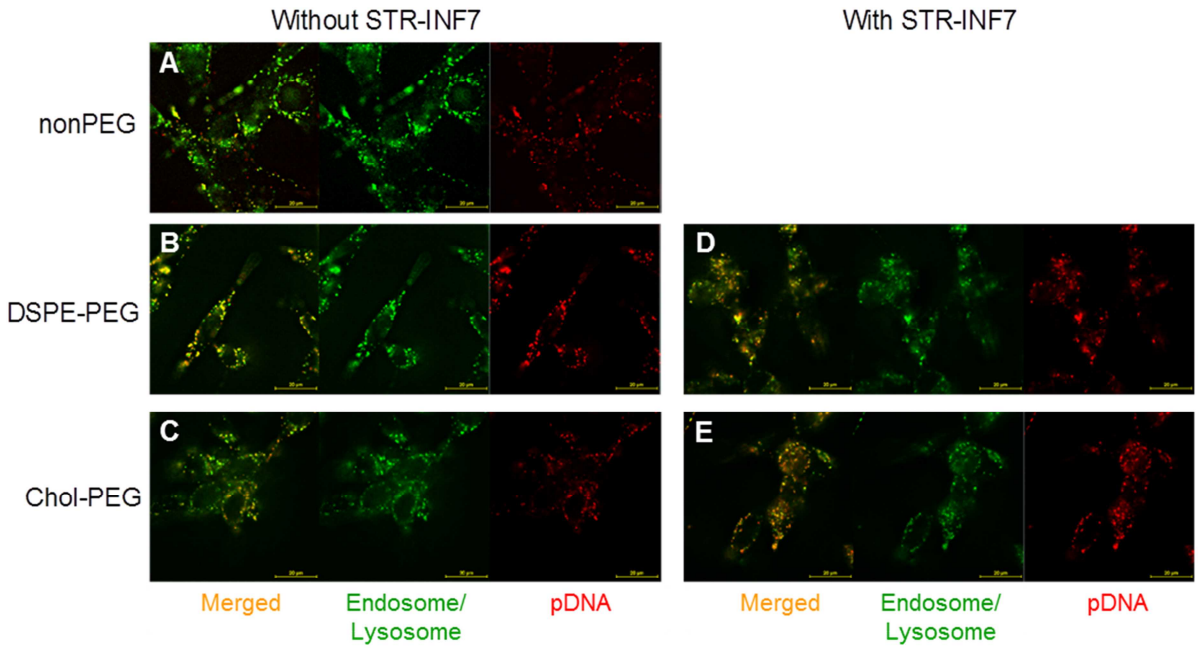



図 4.4-1　MEND の細胞内動態に及ぼす PEG 脂質及び STR-INF7 修飾の影響評価

QD705 によりラベル化した pDNA 封入 MEND を MFLM4 細胞に添加し，3 時間後に Lysotracker Blue によりエンドソーム及びリソソームを染色後，CLSM を用いて MEND（$MEND_{nonPEG}$（A），$MEND_{DSPE\text{-}PEG}$（B），$MEND_{chol\text{-}PEG}$（C），INF/ $MEND_{DSPE\text{-}PEG}$（D），INF/ $MEND_{chol\text{-}PEG}$（E））の細胞内動態を観察した．

赤：pDNA（QD705），緑：エンドソーム/リソソーム（Lysotracker Blue），Bars：10 μm

## 4.5　まとめ

本章では，PEG 脂質は，INF/MEND の凝集を抑制し均一な粒子形成に寄与すると共に，その脂質構造は MEND の遺伝子発現活性に大きな影響を及ぼすことを明らかにした．PEG 脂質は，その脂質構造に依存して，脂肪鎖が短くなるに従い，PEG 脂質と粒子の脂質膜との疎水的結合力が低下し，PEG 脂質が脱離することが報告されている [113]．DSPE-mPEG 及び C16Cera-mPEG は，MEND の遺伝子発現活性を著しく抑制し，C8Cera-mPEG 及び STR-mPEG は，MEND 遺伝子発現活性の抑制は限定的であり，過去に報告されている PEG 脂質の脱離により説明できる結果であった．一方で，Chol-mPEG は上記 PEG 脂質とは異なり，STR-INF7 未修飾時には MEND の遺伝子発現活性が著しく低下するにも関わらず，STR-INF7 修飾により活性が劇的に上昇した．Chol-PEG はコレステロールを含むリポソームに修飾した際，リポソーム膜の流動性を高めることが過去に報告されている [114]．STR-INF7 は膜融合非依存的にエンドソーム膜を破壊するペプチドとして知られているが，膜の流動性が促進された脂質膜に修飾した際には，STR-INF7 が MEND 脂質膜とエンドソーム膜の膜融合を誘起している可能性が考えられた．そのため，$MEND_{chol\text{-}PEG}$ は STR-INF7 修飾により，エンドソーム脱出が促進され，遺伝子発現活性の大幅な上昇につながったと考えられる．

このように PEG 脂質は遺伝子発現活性に大きな影響を及ぼすことから，核酸送達キャリアを設

計する上で，PEG 脂質の選択は非常に重要な鍵を握っている．EPR 効果によって受動的な集積が期待できる癌組織を標的とする場合には，比較的長い脂肪鎖を持つ PEG 脂質を選択して高い血中滞留性を維持しながら，細胞内動態の抑制を最小限に抑える戦略が必要となる．一方で，血中滞留性を必要としない肺などを能動的にターゲットする場合には，PEG 脂質は，脂肪鎖が短いあるいは少ない STR-mPEG，C8Cera-mPEG，dimiristoylgrycerol-PEG（DMG-PEG）を用いて粒子のサイズコントロール及び製剤的安定化を目的として使用し，リガンドによるターゲット効果，細胞内動態への負の影響を最小限に留めることが必要と考える．本章の検討は，*in vitro* 遺伝子発現活性のみの検討であるが，脂質ナノ粒子設計時における PEG 脂質選択の一助になると考えている．

# 総括

## 総括

本研究では，①GALA 修飾リポソームの肺血管内皮標的化メカニズムの解明，②GALA が持つ細胞内動態改善及び肺血管内皮標的化リガンド機能を活かした効率的な siRNA 送達キャリアの構築及び③製造スケールアップを目指したエタノール希釈法による調製を検討することにより，核酸創剤への応用展開を試みた．

第 1 章では，GALA の肺血管内皮標的メカニズムを解明することを目的として，GALA-LPs の肺集積性，血流内の挙動を評価し，その標的分子の同定を試みた．マウス静脈内投与時における体内動態を評価した結果，GALA-LPs は，静脈内投与後，血流内で凝集塊を形成することなく分散して流れ，さらに持続的な肺集積を示した．一方，カチオン性物質を用いた典型的な肺標的キャリアは，血流内で凝集塊を形成し，一過性の肺集積を示したことから，GALA-LPs は肺への集積挙動が従来のキャリアとは大きく異なることを明らかにした．さらに，レクチン処置時における *in vitro* 細胞内取り込み評価より，GALA-LPs はインフルエンザウイルスと同様に細胞表面に提示されているシアル酸糖鎖を認識して細胞内に取り込まれることが示唆され，GALA の意外なメカニズムの一端を明らかにした [115].

第 2 章では，この GALA の機能を活かして，肺血管内皮細胞に siRNA を送達する GALA/MEND の構築を行い，さらに siRNA による肺疾患治療応用を検討した．その結果，siRNA 封入 GALA/MEND は，静脈内投与時に 0.5 mg/ siRNAkg で十分な肺血管内皮細胞ノックダウン効果を示し，既存の siRNA キャリアを凌ぐキャリアを見出すことに成功した．次に，メラノーマ肺転移モデルマウスに siCD31 を封入した GALA/MEND を静脈内投与した結果，ターゲット遺伝子抑制による十分な抗腫瘍効果が得られ，問題となる毒性も見られなかった．これらの結果より，GALA が持つ①エンドソーム脱出促進機能及び②肺血管内皮標的化能を最大限活かして構築された GALA/MEND は siRNA による肺疾患治療への応用の可能性が見出された（図 5）[115, 116].

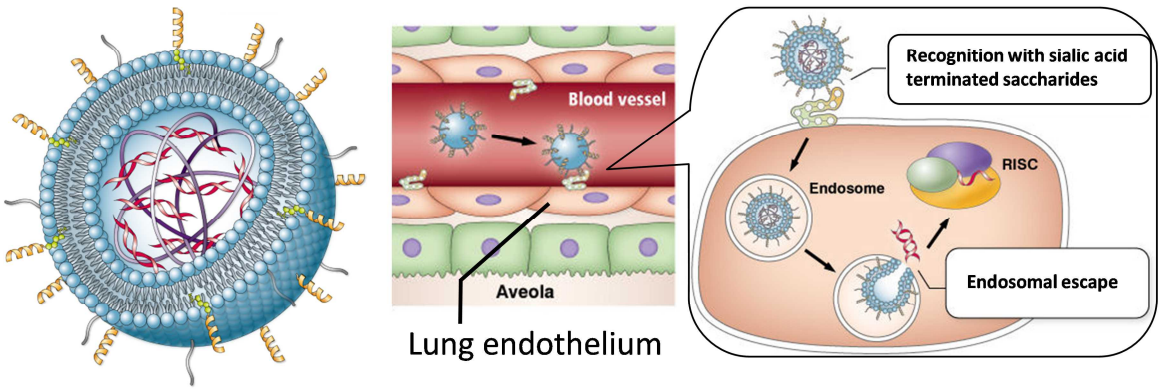



図 5　GALA/MEND の構造及び siRNA 送達メカニズム

第 3 章では，GALA/MEND は工業化に有利なエタノール希釈法による調製も可能であることを見出し，さらに水和法からの製法変更に伴い，ノックダウン効果が約 2 倍増強された [117].

Appendix である第 4 章では, PEG 脂質の脂質構造が pDNA 封入 MEND の細胞内動態に大きな影響を及ぼすことを明らかにした [96]. この研究結果は第 2 章における siRNA 封入 GALA/MEND の組成最適化の一助となった.

これら研究成果により, GALA/MEND は肺血管内皮細胞をターゲットとする核酸送達人工ベクターとして高いポテンシャルを持っていることが示され，実用化への可能性が見出されたと考えている．しかしながら，製薬企業の研究者として，GALA/MEND の実用化を考えた場合，越えるべきハードルはまだ多く残されている．まず，肺血管内皮細胞が強く関与する肺疾患を選定し，適切なターゲット遺伝子を見出すことである．どんなに優秀なキャリアであったとしても，ターゲット疾患，遺伝子とミスマッチであれば，開発候補として次のステージに進むことはできないためである．20 年以上前から DDS 研究が盛んに行われているにも関わらず，実用化に至る数が非常に少ない理由として，この創薬研究と創剤研究のマッチングが適切に行われていないことが要因の一つではないかと考えている．

次に，GMP 基準を満たす製造方法の確立，その品質を担保する評価方法の確立が挙げられる．注射剤は無菌性を保つことが最も重要であり，GALA/MEND の場合，すべての原材料を無菌調達し，無菌下で製造する方法と，粒子調製後にフィルター滅菌する方法が選択肢となりうる．スケールアップについては，エタノール希釈法はマイクロ流路を用いることにより連続的にかつ均一に製造できると考えているが，今後検証が必要である．品質を担保する評価方法の確立は現状では非常にハードルが高い．含量，不純物，不溶性微粒子，エンドトキシンなどの規格に加えて，GALA/MEND が持つ肺血管内皮標的化能, エンドソーム脱出などの高次機能を適切に評価する試験系を構築し，規格を設定する必要がある．しかし，キャリアがオリジナルであるため参考となる情報も少なく，一から築くことが求められる．また，GALA のメカニズムをより明確にすることも重要となる.

このように，医薬品としての開発を考えた場合はさらなる研究が必要となるが，本研究で構築した GALA/MEND は，難治性肺疾患のアンメットメディカルニーズに応える治療技術として新しい道を切り開くことを信じている.

# 5. 実験方法

## 5.1　試薬・材料・細胞・動物

### 5.1.1　Liposome，MEND 調製関連

Chol-mPEG は NOF Co. Ltd.（Tokyo, JAPAN）から購入した. EPC, DOTAP, Cholesterol, DSPE-mPEG, C8Cera-mPEG，C16Cera-mPEG は Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA）から購入した．DOTMA は東京化成工業株式会社（Tokyo, JAPAN）から購入した．Chol-GALA（Cholesteryl-WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALE ALAA-$NH_2$, Mw. 3444.0, ＞71％ putity）は倉敷紡績株式会社に合成を依頼した．Protamine sulfate は CALBIOCHEM より購入した．PEI (branch type, Mw. ave. 10,000)，STR-mPEG は和光純薬株式会社（Tokyo，Japan）より購入した．HEPES は株式会社同仁化学研究所より購入した.

HPLC 用カラム COSMOSIL 5$C_4$-AR-300 (Size 10×250 mm）はナカライテスクより購入した．TFA は関東化学株式会社より購入した．脂質薄膜調製用試験管 (P TYPE TEST-TUBE/P12-M）は日電理化硝子株式会社より購入した.

### 5.1.2　蛍光色素

Lysotracker Blue（DND-22)，Lysotracker Green は Invitrogen（Carlsbad, CA, USA）より購入した．Rho-DOPE は Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA）より購入した．Hoechst 33342 は Sigma-Aldrich（Louis，MO，USA）より購入した.

### 5.1.3　プラスミド調製関連

CMV promoter 支配下でルシフェラーゼ遺伝子を発現する pDNA（pcDNA3.1(+) -Luc）は原島研究室で構築されたものを使用した. アンピシリンナトリウムは和光純薬株式会社より購入した. Bacto Tripton，Bacto Yeast Extract は Becton-Dickinson より購入した．Endfree Plasmid Giga Kit は QIAGEN より購入した．アガロース S は株式会社日本ジーンより購入した.

### 5.1.4　細胞培養関連

ダルベッコ PBS (-) は日水製薬株式会社より購入した．DMEM，L-Glutamine（100×)，FBS，2.5%トリプシン溶液は Invitrogen より購入した．微小血管内皮細胞培地キット-2，内皮細胞培地キット-2 はタカラバイオ株式会社より購入した．Ham's F-12K は和光純薬より購入した．ペニシリン G カリウムは万有製薬株式会社より購入した．硫酸ストレプトマイシンは明治製菓株式会社より購入した．細胞培養用ディッシュ（10 cm），コニカルチューブ（15 mL，50 mL）は Falcon より購入した．35 mm/GLASS BASE DISH は IWAKI より購入した．6 well plate は CORNING より購入した.

### 5.1.5　レクチン

Maackia amurensis Agglutinin（MAM），Sambucus sieboldiana Agglutinin（SSA）は株式会社 J-オイルミルズ（Tokyo，Japan）より購入した．

### 5.1.6　*in vivo* 動物実験関連

#### 5.1.6.1　共通品

ジエチルエーテルは和光純薬株式会社より購入した．イソフルランはアボットジャパン株式会社より購入した．テルモシリンジ（1 mL），注射針(23G×1¼，27G×¾）はテルモ株式会社より購入した．生理食塩水は大塚製薬株式会社より購入した．

#### 5.1.6.2　体内動態解析（RI）実験関連

[Cholesteryl-1,2-$^{3}$H(N)]-cholesteryl hexadecyl ether （ [$^{3}$H]-CHE ）， [γ-$^{32}$P]-adenosine 50-triphosphate（[$^{32}$P]-ATP），Hionic Fluor，Soluene 350 は Perkin Elmer より購入した．プラスチックバイアルは Fisherbrand より購入した．

#### 5.1.6.3　遺伝子発現活性実験関連

Triton X-100 は SIGMA より購入した．Luciferase Assay System は Promega より購入した．臓器破砕用チューブ（Rohren tube）は SARSTEDT より購入した．ルシフェラーゼ活性測定用チューブ（アシストチューブ）はアシストより購入した．BCA Protein Assay Kit は PIERCE より購入した．96 well plate は CORNING より購入した．

#### 5.1.6.4　ノックダウン実験関連

RNAlater は Ambion より購入した. RNA mini kit は QIAGEN より購入した. High Capacity RNA-to-cDNA Kit, TaqMan Gene Expression Master Mix は Applied Biosystems より購入した．siRNA の合成は北海道システムサイエンスに委託した．Primer，Probe の合成はシグマアルドリッチジャパン株式会社に委託した．使用した siRNA，Primer，Probe の配列を以下に示す．

| | |
|---|---|
| siCD31-1 | |
| Sense strand | 5’-GCACAGUGAUGCUGAACAAdTdT-3’ |
| Antisense strand | 5’-UUGUUCAGCAUCACUGUGCdTdT-3’ |
| siCD31-2 | |
| Sense strand | 5’- GUGCAUAGUUCAAGUGACAdTdT-3’ |
| Antisense strand | 5’- UGUCACUUGAACUAUGCACdTdT-3’ |
| siCD31-3 | |
| Sense strand | 5’- GCAAGAAGCAGGAAGGACAdTdT-3’ |
| Antisense strand | 5’- UGUCCUUCCUGCUUCUUGCdTdT-3’ |
| siLuciferase (GL3) | |
| Sense strand | 5’- GCGCUGCUGGUGCCAACCCdTdT-3’ |
| Antisense strand | 5’- GGGUUGGCACCAGCAGCGCdTdT-3’ |

※siCD31 は上記 3 種類を等量混合して使用した.

| | |
|---|---|
| The primers for murine CD31 | |
| Forward | 5'- CAGAGCGGATAATTGCCATTCC -3' |
| Reverse | 5'- ACAGGATGGAAATCACAACTTCATC -3' |
| Probe | 5'- [FAM] ACCCTCAGGATCTCGCTGAACACCGC [TAMRA] -3' |
| The primers for murine CD34 | |
| Forward | 5'-TCTGCCTGGAACTAAGTGAAGC -3' |
| Reverse | 5'-CCTCAGACTGGGCTAGAAGCA -3' |
| Probe | 5'-[FAM] ACCAGCATCAGCCTCAGCCTCCTCC [TAMRA] -3' |

### 5.1.7 細胞

ヒト子宮頚癌由来細胞（HeLa）は理研セルバンクより購入した．ヒト肺微小血管内皮細胞（HMVEC-L）はタカラバイオ株式会社より購入した．マウス胎児肺間葉細胞（MFLM-4）は Seven Hills Bioreagents（Cincinnati Children's Research Foundation Burnet Ave Cincinnati，Ohaio，U.S.A.）より購入した．マウスメラノーマ細胞（B16-F10-luc2）は Caliper Life Science（MA，U.S.A）より購入した.

### 5.1.8 マウス

ICR マウス雄 5 週齢，C57BL/6N マウス雄 6 週齢は日本 SLC より購入した．BALB/c ヌードマウス雌 8 週齢はオリエンタル酵母工業株式会社より購入した.

## 5.2 機器

### 5.2.1 Liposome，MEND 調製関連

脂質薄膜の調製には，ポンプ DIVAC 1.2，トラップ EVALA UNI TRAP UT-1000（いずれも東京理科器械）を用いた．超音波処理には，浴槽型ソニケーターAU-25C（アイワ医科工業）を使用した．動的光散乱（DLS）による粒子径，ζ電位の測定には，ZETA SIZER Nano-ZS（Malvern Instruments Ltd.）を用いた.

### 5.2.2 培養関連

細胞培養のための $CO_2$ インキュベーターには，5400（NAPCO）を用いた．大腸菌培養には，Microincubetor M-36（TAITEC），Bioshaker BR-11UM（TAITEC），MULTI REACC MR-40（和科盛商会）を用いた.

### 5.2.3 遠心分離関連

低速冷却遠心機には，CF7D2（HITACHI），LX-125（TOMY）を用いた．微量高速冷却遠心機には，1920（KUBOTA），MZ-200（TOMY）を用いた．超高速冷却遠心機には，CR22E [ロー

ター #RPR9-2-537（大腸菌），#R12A2（プラスミド）］（HITACHI）を用いた．

### 5.2.4　測定機器関連

吸光度の測定には，SPECTROPHOTOMETER DU640（Beckman Coulter），マイクロプレートリーダーBenchmarh plus（Bio-Rad）を用いた．ルシフェラーゼ活性の測定には，Luminescencer AB-2200（ATTO）を用いた．Real-time PCR には，ABI 7500 real-time system（Applied Biosystems）を用いた．β線の測定には，液体シンチレーションカウンターTRI-CABB 1600TR（PACKARD）を用いた．

### 5.2.5　HPLC 関連

HPLC には Agilent Technologies 1200 Series（Agilent Technologies）を用いた．凍結乾燥機には，VD-500F（TAITEC）を用いた．

### 5.2.6　動物実験関連

ホモジナイザーには，POLYTRON（KINEMATICA）を用いた．

### 5.2.7　一般操作関連

オートクレーブには，BS-325，BS235（いずれも TOMY）を用いた．逆転写反応には，PCR サーマルサイクラーTP3000（タカラバイオ株式会社）を用いた．サンプルの加熱処理には，MULTI HEATER type MH-36（和科盛商会）を用いた．サンプルの攪拌には，スターラーTR-300（Pasolina）を用いた．pH 測定には，Docu-$pH_{Meter}$（Sartorius）を用いた．

## 5.3　試薬調製

10 mM HEPES buffer（HB）

HEPES（DOJINDO）119.2 mg を秤量し，DDW 40 mL に溶解後 1N NaOH で pH 7.4 に合わせた．これを DDW で 50 mL にメスアップし，0.2 μm のフィルターろ過により滅菌し，4℃で保存した．

10 mM HEPES buffer-5% Glucose（HBG）

HEPES（DOJINDO）119.2 mg と Glucose 2.5 g を秤量し，DDW 40 mL に溶解後 1N NaOH で pH 7.4 に合わせた．これを DDW で 50 mL にメスアップし，0.2 μm のフィルターろ過により滅菌し，4℃で保存した．

非働化胎児牛血清（FBS）

胎児牛血清を 4℃で溶解し，56℃で 30 分間加熱を行った後，50 mL ずつ分注し-20℃で保存した．

DMEM

DMEM 29.94 g，ペニシリン G 50 mg，硫酸ストレプトマイシン 0.3 g，$NaHCO_3$ 11.1 g を評量し，DDW 3 L に溶解後，Bottom-Top Filter 0.22 μM（IWAKI）を用いてろ過滅菌を行った後，

450 mL ずつ分注し 4℃で保存した.

DMEM（＋FBS）

非働化 FBS 50 mL を DMEM 450 mL に添加・混合した後，4℃で保存した.

0.5%トリプシン-5 mM ETDA 溶液

EDTA・2Na・2$H_2O$ 0.19 g, NaCl 0.63 g, $NaH_2PO_4$・2$H_2O$ 0.19 g を秤量し，DDW で溶解後 NaOH で pH 7.4 に調整し，80 mL にメスアップした．これをオートクレーブ滅菌後室温に冷やし，2.5% トリプシン 20 mL を添加し，4℃で保存した.

LB 培地

Bacto Trypto 10.0 g，Yeast extract 5.0 g，NaCl 5.0 g を評量し，DDW 1 L に溶解後，オートクレーブ滅菌した．その後，ある程度温度が下がってから，必要に応じて，アンピシリン（終濃度 50 mg/L）を添加し，4℃で保存した.

HPLC buffer A（$H_2O$/0.1% TFA）

DDW に TFA を 0.1%（v/v）となるように添加した後，MILLCUP－LH（Millpore）を用いてフィルターろ過した．その後，超音波処理をすることで脱気した後，使用した.

HPLC buffer B（$CH_3CN$/0.1% TFA）

$CH_3CN$ に TFA を 0.1%（v/v）となるように添加した後，MILLCUP－LH を用いてフィルターろ過した．その後，超音波処理をすることで脱気した後，使用した.

*in vivo* lysis buffer

0.1 M Tris-HCl（pH 7.8）に対して 0.1% Triton-X100，2 mM EDTA となるようにそれぞれ添加し，4℃で保存した.

Krebs Henseleit Buffer（Krebs Buffer）

KCl 0.18 g，KH2 PO4 0.065 g，MgSO4 ・7H2 O 0.1475 g，HEPES 1.4875 g，CaCl・2H2 O 0.1122 g，NaCl 3.45g，NaHCO3 1.0 g を DDW 500 mL 弱に溶解させ，NaOH にて pH 7.3 に調整し，DDW で 500 mL にメスアップした．これを 0.2 μm フィルターろ過により滅菌し，4℃で保存した．使用時は 5 mM となるようにグルコースを添加した.

## 5.4　一般的操作

脂質溶液の調製

使用した脂質は，適量の EtOH で希釈する事で任意の濃度（1～10 mM）に調製した.

HPLC による Chol-GALA 精製

Cholesteryl-GALA（Chol-GALA）は COSMOSIL 5$C_4$-AR-300（Size 10×250 mm）を用いて逆相 HPLC を行い精製した. $H_2O$/0.1% TFA を Buffer A, $CH_3CN$/0.1% TFA を Buffer B とした. Chol-GALA（Purity: ＞71%）を DMF に溶解したもの（Crude として 4 mg/mL） を注入したのち，流速 2.0 mL/min，25℃で，50% B→95% B（20 min）とグラジエントをかけた（詳細は下記）．215 nm における吸光度で検出することで Chol-GALA を回収し，凍結乾燥させた．精製

した Chol-GALA は，HPLC で純度を確認した後，1 mM EtOH 溶液として分注し，-80℃で保存した.

＜条件＞

インジェクション量：250 μL（4 mg/mL in DMF）

流速：2 mL/min

カラム温度：25℃

プロトコル：

| Time（min） | Buffer B（%） |
|---|---|
| 0 | 50 |
| 20 | 95 |
| 40 | 95 |
| 40.5 | 100 |
| 45.5 | 100 |
| 46 | 50 |
| 60 | 50 |

粒子径・ζ電位測定

Liposome，MEND の粒子径とζ電位は Zetasizer Nano ZS（Malvern Instruments, UK）を用いて測定した.

統計解析

実験データは，特に断りのない限り 3 回以上の実験値の平均値±標準偏差で表記した．また，*in vivo* 実験 では平均値±標準誤差で表記した. 有意差検定は, One-way ANOVA により検定を行い，さらに Dunnett 法にて多重比較を行い，$p< 0.05$ を有意差ありとした．図 3.5-1 のみ，有意差検定は，Mann-Whitney の U 検定を用い，$p< 0.05$ を有意差ありとした.

## 5.5　第 1 章の実験

Liposome（LPs）の調製

1) 脂質薄膜の調製

ガラス試験管に EPC（EtOH 溶液），Chol（EtOH 溶液），STR-mPEG をモル比 70:30:5 になるように添加し，EtOH を適当量添加後，デシケーターで減圧乾燥し，溶媒を留去することで，脂質薄膜を調製した．Chol-GALA を修飾する際には，総脂質量の 2 mol%を脂質溶液中に添加した. また, CationLPs を調製する場合には, DOTMA (EtOH 溶液), Chol, EPC をモル比 30:40:30 とし，上記と同様の操作で脂質薄膜を調製した.

2) LPs の調製

調製した脂質薄膜に脂質濃度が 2.64 mM（*in vivo* 実験），0.55 mM（*in vitro* 実験)となるように HBG（*in vivo* 実験），HB（*in vitro* 実験）を添加後，室温で 15 分以上水和した．その後，浴

槽型ソニケーターで約 1 分間超音波処理を行うことで，LPs を調製した．

LPs の体内動態評価

1） LPs の投与，臓器の回収，[$^3$H]の測定

LPs の脂質膜を[$^3$H]で標識することで投与サンプルとした．

10 μL LPs/g mouse の条件で，マウス（ICR，6 週齢，♂）尾静脈より投与した．投与 5 分後あるいは 6 時間後にエーテル麻酔によりマウスを処置した後，開腹し，脱血した後，各臓器（肺，肝臓）を摘出した．生理食塩水で臓器をよく洗浄し，重量を測定した後*，プラスチックバイアルに入れ，2 mL の Soluene-350 を添加し，50℃で一晩インキュベーションすることで組織を溶解させた．この溶液に対して，$H_2O_2$ 300 μL（100 μL×3）添加することで脱色処理をした後，Hionic fluor 10 mL を添加しよく混合させた．4℃で一晩静置し，液体シンチレーションカウンターにて[$^3$H]のカウントを測定した．また，[$^3$H]の投与量を評価するため，投与した LPs サンプル 10 μL に対して Hionic fluor 10 mL を添加し，よく混合させた後，4℃で一晩静置し，同様に[$^3$H]のカウントを測定した．

*肝臓に関しては，肝臓を細断後よく混合し 0.2～0.3 g を使用した．

2） 臓器特異性評価

各臓器サンプル 1 g あたりの[$^3$H]カウント（測定値）* を投与した LPs に含まれる[$^3$H]で除することで，投与量に対する臓器移行量を%ID/g organ として算出した．

IVRTCLSM を用いた LPs の挙動観察

LPs の脂質膜を Rho-DOPE（総脂質量の 0.1 mol%）で標識することでサンプルとした．2.0-3.0%イソフルラン麻酔下で BALB/c ヌードマウス（8 週齢，♀）の尾静脈に 30 G 注射針を接続したカテーテルを留置した．マウスに LPs を総脂質量 528 nmol の投与量で留置したカテーテルより観察開始 10 秒後に尾静脈内投与し，マウス耳介皮膚静脈内を流れるリポソームの挙動をリアルタイム生体内共焦点レーザー顕微鏡（IVRTCLSM）により直接観察した．CLSM は対物上下動式正立顕微鏡 ECLIPSE FN1 を接続した A1R（Nikon）を用いた．動画は，30 frames/s で 10 秒間撮影，50 秒間休止を繰り返し，投与後 10 分間撮影した．

凝集の程度は得られた動画から 5 秒毎に抽出した画像中の Cy3 蛍光強度の変動係数（C.V.）を用いて定量化した．C.V.値は血管領域中から抽出した関心領域（ROI）における蛍光強度の標準偏差を平均値で除することにより算出している．算出した C.V.値は 5 秒ごとにプロットした．

LPs の細胞内取り込み

LPs の脂質膜を Rho-DOPE（総脂質量の 1.0 mol%）で標識することでサンプルとした．35 mm/GLASS BASE DISH に $4\times10^4$ cells で HMVEC-L 細胞を継代し，24 時間培養した．ディッシュ内の培養液を除去し，Krebs Buffer 1950 μL 及び LPs 50 μL（総脂質量 27.5 nmol）を添加した．37℃，5%$CO_2$ 存在下で 2 時間インキュベーションした．レクチンによる阻害実験は，1 あるいは 10 μm レクチンを 30 分間プレインキュベーション後，LPs 添加前に Krebs Buffer で 3 回洗浄した．シアル酸による阻害実験は，1 あるいは 10 μm シアル酸を 30 分間プレインキュベ

ーション後，LPs を添加した．エンドソーム/リソソーム及び核を染色後，Krebs Buffer で 3 回洗浄した後，Krebs Buffer を添加し，CLSM を用いて細胞を観察した．なお，エンドソームを染色する際には，観察 30 分前に LysoTracker Green（1 mM，invitrogen）を 2 μL 添加した．核を染色する際には，観察 10 分前に Hoechst33342（1 mg/mL，SIGMA）を 2 μL 添加した．

CLSM は FV10i-LIV（Olympus）を用いた．観察には，水浸 60 倍対物レンズ（UPlanSApo 60x/NA 1.2）及びダイクロイックミラー（DM405/473/559/635）を用いた．光源は，レーザダイオードを用い，励起光として，352 nm，473 nm，559 nm を用いた．蛍光検出チャンネルとして，フィルターは，Ch1: 455（Blue，Hoechst 33342），Ch2: 490-540（Green，Lysotracker Green），Ch3: 570-620（Red，Rhodamine）を用いた．

pDNA 封入 MEND の調製

1） 脂質薄膜の調製

ガラス試験管に DOTAP（EtOH 溶液），EPC（EtOH 溶液），Chol（EtOH 溶液）をモル比 30:40:30 になるように添加し，EtOH を適当量添加後，デシケーターで減圧乾燥し，溶媒を留去することで，脂質薄膜を調製した．Chol-GALA，STR-INF7 を修飾する際には，それぞれ，総脂質量の 2 mol%，3 mol%を脂質溶液中に添加した．

2） Condensed pDNA（DNA コア粒子）の調製

本研究では，Protamine を用いて pDNA の凝縮化を行い，Charge ratio（+/-）= 1.0 となるように DNA コア粒子を調製した．ボルテックス中，0.1 mg/mL の pDNA 溶液に対して，0.1 mg/mL の Protamine 溶液を滴下し，室温で 15 分間以上インキュベーションすることで調製した．pDNA 溶液，Protamine 溶液は，HBG により希釈したものを用いた．

3） MEND の調製

脂質薄膜を調製した試験管に，DNA コア粒子溶液を，脂質濃度が 0.55 mM になるように添加後，室温で 15 分以上水和させた．その後，浴槽型ソニケーターで約 1 分間超音波処理を行うことで，MEND を調製した．

pDNA 封入 MEND の体内動態評価

1） MEND の投与，臓器の回収，[$^3$H]の測定

MEND の脂質膜を[$^3$H]で標識することで投与サンプルとした．

10 μL MEND/g mouse の条件で，マウス（ICR，5 週齢，♂）尾静脈より投与した．投与 6 時間後にエーテル麻酔によりマウスを処置した後，開腹し，脱血した後，肺を摘出した．生理食塩水で肺をよく洗浄し，重量を測定した後，プラスチックバイアルに入れ，2 mL の Soluene-350 を添加し，50℃で一晩インキュベーションすることで組織を溶解させた．この溶液に対して，$H_2O_2$ 300 μL（100 μL×3）添加することで脱色処理をした後，Hionic fluor 10 mL を添加しよく混合させた．4℃で一晩静置し，液体シンチレーションカウンターにて[$^3$H]のカウントを測定した．また，[$^3$H]の投与量を評価するため，投与した MEND サンプル 10 μL に対して Hionic fluor 10 mL を添加し，よく混合させた後，4℃で一晩静置し，同様に[$^3$H]のカウントを測定した．

2) 臓器集積性評価

肺サンプル 1 g あたりの[$^3$H]カウント（測定値）を投与した LPs に含まれる[$^3$H]で除することで，投与量に対する肺移行量を%ID/g organ として算出した.

## 5.6 第 2 章の実験

pDNA 封入 MEND の調製

1) 脂質薄膜の調製

ガラス試験管に DOTAP（EtOH 溶液），EPC（EtOH 溶液），Chol（EtOH 溶液），PEG（DSPE-mPEG，Chol-mPEG，STR-mPEG）（EtOH 溶液）をモル比 30:40:30:5 になるように添加し，EtOH を適当量添加後，デシケーターで減圧乾燥し，溶媒を留去することで，脂質薄膜を調製した．Chol-GALA を修飾する際には，総脂質量の 2 mol%を脂質溶液中に添加した.

2) Condensed pDNA（DNA コア粒子）の調製

第 1 章と同様の手法により調製した.

3) MEND の調製

第 1 章と同様の手法により調製した.

pDNA 封入 MEND の体内動態評価

第 1 章と同様の手法により評価した.

pDNA 封入 MEND の遺伝子発現活性評価

(1) *In vitro* トランスフェクション

トランスフェクション 24 時間前に MFLM-4 細胞（4x10$^4$ cells/0.5mL/well）を 24 well plate に播種し，37℃，5% $CO_2$ 条件下でインキュベーションした．DMEM (-) 0.5mL を用いて細胞を洗浄後，DMEM (-，2mM Glutamine) を用いて希釈した MEND 250 µL を細胞に添加し，37℃，5% $CO_2$ 条件下でインキュベーションした．トランスフェクション 3 時間後，サンプル溶液を除去し，FBS を 10% 含む DMEM 0.5mL に置換後，37℃，5% $CO_2$ 条件下でインキュベーションした．DMEM に置換してから 21 時間後に PBS (-) 0.5mL を用いて細胞を洗浄し，1x Lysis Buffer 75 µL を添加後，-80℃にて 30 分以上静置した.

(2) ルッシフェラーゼ活性測定

室温でサンプルを融解後，セルスクレーパで細胞を剥離し，全量（75 µL）をエッペンドルフチューブに移した．遠心分離（15,000rpm，4℃，2 分間）後，上清 50 µL を測定用サンプルとした．上清 20 µL に Luciferase assay reagent 50 µL を添加し混合後，ルッシフェラーゼ活性測定を行った.

(3) BCA タンパク定量

上清 10 µL に BCA assay reagent 200 µL 添加し，37℃で 30 分間インキュベーション後，吸光度を測定（562nm）した.

(4) ルッシフェラーゼ活性評価

MEND のルシフェラーゼ活性はタンパク質量当たりの相対蛍光強度（RLU/mg protein）として算出した.

siRNA 封入 MEND の調製

1）脂質薄膜の調製

ガラス試験管に DOTMA（EtOH 溶液），Chol（EtOH 溶液），EPC（EtOH 溶液），PEG（CeraC8-mPEG，STR-mPEG）（EtOH 溶液）をモル比 30:40:30:1～10 になるように添加し，EtOH を適当量添加後，デシケーターで減圧乾燥し，溶媒を留去することで，脂質薄膜を調製した．Chol-GALA を修飾する際には，総脂質量の 1～4 mol%を脂質溶液中に添加した.

2）siRNA complex（siRNA コア粒子）の調製

Charge ratio (+/-) = 1.8 となるように PEI/siRNA complex を調製した. ボルテックス中, 0.333 mg/mL の siRNA 溶液に対して, 0.125 mg/mL の PEI 溶液を滴下（volume 比　siRNA 溶液 : PEI 溶液 = 6:4）し，室温で 15 分間以上インキュベーションすることで調製した．siRNA 溶液及び PEI 溶液は，HBG により希釈したものを用いた.

3）MEND の調製

脂質薄膜を調製した試験管に，siRNA コア粒子溶液を，脂質濃度が 2.64 mM になるように添加後，室温で 15 分以上水和させた．その後，浴槽型ソニケーターで約 1 分間超音波処理を行うことで，MEND を調製した.

siRNA 封入 MEND のノックダウン評価

1） *in vivo* transfection

マウス（C57BL/6N，6w，♂）の尾静脈より MEND 溶液（投与量 : 0.2-4.0 mg /kg）を投与した（27G の注射針を使用）．尾静脈投与 24 時間後に，エーテル麻酔によりマウスを処置した後，開腹し，肺を摘出した．摘出した臓器は，RNAlater に浸し，4℃で一晩置いたのち，-20℃で保存した.

2）mRNA 抽出

-20℃で保存した臓器サンプルを室温に戻し，20-30 mg を評量したのち，RNA mini kit 及び QIA cube（QUIAGEN）を用いて添付のプロトコルに従い RNA 抽出を行った.

3）逆転写反応

Total RNA 1 μg を High Capacity RNA-to-cDNA Kit を用いて添付プロトコルに従い，cDNA を調製した. Denature 及び逆転写反応は, サーマルサイクラーを用いて, Denature (65 ℃, 5 min →4 ℃, hold)，逆転写反応（42 ℃, 60 min→95 ℃, 5 min→4 ℃, hold）の条件で行った.

4）Real-time PCR 法による mRNA 定量

TaqMan 法に基づいた相対定量法（ΔΔCt 法）を用いて mRNA（CD31）の定量を行った．目的の濃度に希釈した cDNA 5 μL に対して, 100 μM Upper Primer 0.25 μL, 100 μM Lower Primer 0.25 μL，100 μM probe 0.0625 μL，filtrated DDW 6.9375 uL，TaqMan M.M.2× 12.5 μL 添加した後，95 ℃，10 min で初期変性を行った後，95 ℃，15 sec の PCR 変性反応，60 ℃，1 min

のアニーリング/伸長反応を 1 サイクルとして 40 サイクル PCR 反応を行った．CD34 を内部標準遺伝子として，ΔΔCt 法による相対定量を用いて CD31 の mRNA 量を算出した．

IVRTCLSM を用いた siRNA 封入 MEND の挙動観察（耳介皮膚静脈）

MEND の siRNA を Cy3-siRNA により 50%置換することにより蛍光標識 MEND を調製した．2.0-3.0%イソフルラン麻酔下で BALB/c ヌードマウス（8 週齢，♀）の尾静脈に 30 G 注射針を接続したカテーテルを留置した．マウスに MEND を 1 mg siRNA/kg の投与量で留置したカテーテルより観察開始 10 秒後に尾静脈内投与し，マウス耳介皮膚静脈内を流れるリポソームの挙動を IVRTCLSM により直接観察した. CLSM は対物上下動式正立顕微鏡 ECLIPSE FN1 を接続した A1R（Nikon）を用いた．動画は，30 frames/s で 10 秒間撮影，50 秒間休止を繰り返し，投与後 10 分間撮影した．

凝集の程度は得られた動画から 5 秒毎に抽出した画像中の Cy3 蛍光強度の変動係数（C.V.）を用いて定量化した．C.V.値は血管領域中から抽出した関心領域（ROI）における蛍光強度の標準偏差を平均値で除することにより算出している．算出した C.V.値は 5 秒ごとにプロットした．

IVRTCLSM を用いた siRNA 封入 MEND の挙動観察（肺毛細血管）

MEND の siRNA を Cy3-siRNA により 50%置換することにより蛍光標識 MEND を調製した．2.0-3.0%イソフルラン麻酔下で BALB/c ヌードマウス（8 週齢，♀）の尾静脈に 30 G 注射針を接続したカテーテルを留置した．血管を可視化するため，マウスに Evans Blue を尾静脈内投与し，その後，Cy3 標識 siRNA 封入 MEND を 1 mg siRNA/kg の投与量で観察開始 10 秒後に尾静脈内投与し，マウス肺毛細血管内を流れる MEND の挙動を IVRTCLSM により直接観察した．CLSM は対物上下動式正立顕微鏡 ECLIPSE FN1 を接続した A1R（Nikon）を用いた．動画は，30 frames/s で 10 秒間撮影，50 秒間休止を繰り返し，投与後 10 分間撮影した．

凝集の程度は得られた動画から 1 分毎に抽出した画像中の 5 箇所における Cy3 蛍光強度の変動係数（C.V.）を算出し定量化した．C.V.値は血管領域中から抽出した関心領域（ROI）における蛍光強度の標準偏差を平均値で除することにより算出している．算出した C.V.値は 5 箇所の ROI の平均値±SD を示している．

GALA/MEND の腫瘍増殖抑制評価

1) 肺転移癌モデルマウスの作製

250 $cm^2$ フラスコで 10% FBS 含有 RPMI-1640 を用いて培養したルシフェラーゼ（GL4）安定発現 B16F10-luc2 細胞を PBS に懸濁し，$2x10^5$ cells/100uL/mouse を 27G 注射針を用いて C57BL/6N マウス（6 週齢，♂）の尾静脈より投与し，メラノーマ肺転移モデルマウスを作製した．

2) 治療プロトコル

メラノーマ細胞移植後，翌日より 3 日間隔でコントロール siRNA（siGL3）あるいは siCD31 を封入した GALA/MEND を投与量 1 mg siRNA/kg で移植後 16 日目まで計 6 回尾静脈内投与した．移植後 17 日目に，エーテル麻酔によりマウスを処置した後，開腹し，血液を下大静脈より

採取後，肺を摘出した．摘出した肺は，湿重量を測定した後，半分をルシフェラーゼ活性用として，サンプルチューブにいれ，液体窒素で凍結させ，残りの半分をノックダウン活性用として，RNAlater に浸し，4℃で一晩置いたのち，-20℃で保存した．

3) 肺ルッシフェラーゼ活性測定

全ての操作は氷上で行った．アシストチューブ中で凍結肺サンプルに対して *in vivo* lysis buffer 1 mL を添加し，肺サンプルを解凍させたのち，ホモジナイザー（POLYTRON）を用いてホモジナイズした（出力 10，20 sec，氷上）．ホモジェネート 700 μL をサンプルチューブに回収した後，遠心（4℃，13,000 rpm，10 分間）し，その上清 20 μL を Luciferase assay substrate 50 μL と混合させた後，ルミノメーターでルシフェラーゼ活性を測定した*．ルシフェラーゼ活性は肺臓器あたりの相対蛍光強度（RLU/lung）として算出した．

*ルシフェラーゼ活性の測定は，Analysis time: 15 sec，Integral time: Start 6 sec，End 15 sec という測定条件で行った．

4) ノックダウン活性

上記記載方法に従い，評価した．

5) 肝毒性評価

得られた血液は，4℃で静置し，完全に凝固した後，遠心（10000 rpm，4℃，10 分間）により血清を調製した．AST 及び ALT はトランスアミナーゼ CII テスト（和光）を用いて，添付のプロトコルに従い測定した．

## 5.7 第 3 章の実験

単純水和法による siRNA 封入 MEND の調製

1) 脂質薄膜の調製

ガラス試験管に DOTMA（EtOH 溶液），Chol（EtOH 溶液），EPC（EtOH 溶液），STR-mPEG（EtOH 溶液）をモル比 30:40:30:5 になるように添加し，EtOH を適当量添加後，デシケーターで減圧乾燥し，溶媒を留去することで，脂質薄膜を調製した．Chol-GALA を修飾する際には，総脂質量の 2 mol%を脂質溶液中に添加した．

2) siRNA complex（siRNA コア粒子）の調製

第 2 章と同様の手法により調製した．

3) MEND の調製

第 2 章と同様の手法により調製した．

エタノール希釈法による siRNA 封入 MEND の調製

1) siRNA complex（siRNA コア粒子）の調製

第 2 章と同様の手法により調製した．

2) MEND の調製

ボルテックス下で脂質（DOTMA/Chol/EPC/STR-mPEG, 30:40:30:5（モル比），脂質濃度：4.4 mM）

を含む 1.2 mL エタノール溶液に 2.8 mL siRNA/PEI コア水溶液を滴下し，エタノール濃度を 30%とすることで，siRNA/PEI コアと脂質の複合体を形成させる．ここに，4.0 mL HBG を一気に加えてエタノールを希釈して，MEND を調製した．最後に，溶液中のエタノールの除去及び MEND の濃縮を目的として，Amicon Ultra-4（ミリポア）を用いて遠心（1000 g，30 分間，室温）することにより，限外ろ過した．カラム上に残った液に 4 mL HBG を添加し，再度遠心し，限外ろ過することにより，実験に供する MEND を得た．なお，Chol-GALA を修飾する際には，総脂質量の 2 mol%を脂質溶液中に添加した．

siRNA 封入 MEND のノックダウン評価

第 2 章と同様の手法により評価した．

siRNA 封入 MEND の体内動態評価

1） MEND の投与，臓器の回収，[$^{3}$H]及び[$^{32}$P]の測定

MEND の脂質膜を[$^{3}$H]，siRNA を[$^{32}$P]で標識することで投与サンプルとした．

マウス（ICR，5 週齢，♂)の尾静脈より MEND 溶液（投与量：2 mg/kg）を投与した（27G の注射針を使用）．投与 1 時間後にエーテル麻酔によりマウスを処置した後，開腹し，下大静脈より血液を採取した後（23G の注射針を使用），各臓器（肺，肝臓，脾臓）を摘出した．生理食塩水で臓器をよく洗浄し，重量を測定した後*，0.1 mg 程度をプラスチックバイアルに入れ，2 mL の Soluene-350 を添加し，50℃で一晩インキュベーションすることで組織を溶解させた．この溶液に対して，$H_2O_2$ 300 μL（100 μL×3）添加することで脱色処理をした後，Hionic fluor 10 mL を添加しよく混合させた．4℃で一晩静置し，液体シンチレーションカウンターにて[$^{3}$H]，[$^{32}$P]のカウント（dpm）を測定した．また，未投与マウスから摘出した肺に既知量の MEND 溶液を添加し同様の操作を行うことで検量線を作製し，[$^{3}$H] ，[$^{32}$P]の肺への移行量を算出した．

*肝臓に関しては，肝臓を細断後よく混合し 0.2 g 程度を使用した．

2） 臓器集積性評価

各臓器サンプル 1 g あたりの[$^{3}$H]あるいは[$^{32}$P]カウント（測定値）を投与した MEND に含まれる[$^{3}$H] あるいは[$^{32}$P]で除することで，投与量に対する肺移行量を%ID/g organ として算出した．

[$^{32}$P]-siRNA の合成

siRNA は T4 polynucleotide kinase（T4 PNK, Takara Shuzo Co. Ltd.）及び[γ-$^{32}$P]Adenosine5'-triphosphate（[$^{32}$P]-ATP，PerkineElmer）を用いて標識した．siRNA への[$^{32}$P]-ATP の修飾は，3.25 μL siCD31（0.2 mg/mL），29.8 μL DEPC 処理水，5 μL T4 PNK buffer，2 μL T4 PNK（10 units/μL）及び[$^{32}$P]-ATP (2 μL10 TBq/mmol)を混合後，37℃で 3 時間振とうしながらインキュベーションした．修飾されなかった[$^{32}$P]-ATP を除去するため，この反応液を Amicon Ultra（MWCO 10,000; Millipore Corp.）のカラム上部に添加し，遠心した（15500g，6min，25℃）．その後，450 μL DEPC 処理水をカラム上部に添加し，遠心（15500g，6min，25℃）を 8 回繰り返し，[$^{32}$P]-siRNA を得た．

siRNA 封入 MEND の細胞内動態評価

Cy5-siRNA を含む siRNA コアを調製し，GALA/MEND に封入することにより，蛍光標識した．

35 mm/GLASS BASE DISH に $1\times10^5$ cells で HeLa 細胞を継代し，37℃，5%$CO_2$ 存在下で 24 時間培養した．PBS 1.5 mL を用いて細胞を洗浄後，DMEM (-，2mM Glutamine) を用いて希釈した MEND 1.5 mL を細胞に添加し，37℃，5% $CO_2$ 条件下で 6 時間インキュベーションした．PBS 1.5mL を用いて細胞を 2 回洗浄後，1.5 mL Krebs Buffer を添加し，観察 30 分前に LysoTracker blue DND-22（1 mM，invitrogen）を 2 μL 添加することによりエンドソーム/リソソームを染色し，CLSM（Nikon A1（Nikon））を用いて細胞を観察した．

## 5.8　第 4 章の実験

pDNA 封入 MEND の調製

1) 脂質薄膜の調製

ガラス試験管に DOTAP（EtOH 溶液），EPC（EtOH 溶液），Chol（EtOH 溶液），PEG（DSPE-mPEG，C16Cera-mPEG，C8Cera-mPEG，Chol-mPEG，STR-mPEG）をモル比 30:40:30:5 になるように添加し，EtOH を適当量添加後，デシケーターで減圧乾燥し，溶媒を留去することで，脂質薄膜を調製した．Chol-GALA，STR-INF7 を修飾する際には，それぞれ，総脂質量の 2 mol%，3 mol%を脂質溶液中に添加した．

2) Condensed pDNA（DNA コア粒子）の調製

第 1 章と同様の手法により調製した．

3) MEND の調製

第 1 章と同様の手法により調製した．

pDNA 封入 MEND の遺伝子発現活性評価

第 1 章と同様の手法により評価した．

pDNA 封入 MEND の細胞内動態評価

Mirus Label IT CX-biotin nucleic acid labeling kit（Mirus Corp., Madison, WI, USA）を用いて QD705 によりラベル化した pDNA を MEND に封入することにより蛍光標識した．

35 mm/GLASS BASE DISH に $1\times10^5$ cells で MFLM-4 細胞を継代し，37℃，5%$CO_2$ 存在下で 24 時間培養した．PBS 1.5 mL を用いて細胞を洗浄後，HB を用いて希釈した MEND 1.0 mL を細胞に添加し，37℃，5% $CO_2$ 条件下で 3 時間インキュベーションした．PBS 1.5 mL を用いて細胞を洗浄後, DMEM を添加し, 観察 30 分前に LysoTracker blue DND-22（1 mM, invitrogen）を 2 μL 添加することによりエンドソーム/リソソームを染色し，油浸 100 倍対物レンズ（Nikon PlanApo 100x/1.4）を装着した Wide Field 蛍光顕微鏡（ECLIPSE TE200-U（Nikon））を用いて細胞を観察した．QD705 は，436/10 の励起フィルターを用い，ダイクロイックミラー（82100v2bs; Chroma Technology Corp., Rockingham, VT, USA）及び 700/75 のバリアフィルターを通して検出した．LysoTracker blue は，350/50 の励起フィルターを用い，ダイクロイックミラー（82100v2bs）及び 450/20 のバリアフィルターを通して検出した．

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり，終始懇篤なる御指導，御鞭撻を賜りました，北海道大学大学院薬学研究院　薬剤分子設計学研究室教授，原島秀吉先生に深く感謝致します.

本研究を遂行するにあたり，終始，直接の御指導，数々の有益な御助言を賜りました，北海道大学大学院薬学研究院　薬剤分子設計学研究室准教授，秋田英万先生に心より感謝致します.

本研究を行う機会を与えて下さり，格別のご配慮と御激励を賜りました，大鵬薬品工業株式会社　CMC 本部　馬場一彦本部長，分析科学研究所　木下真宏所長，製剤研究所　鈴木公正所長に厚く御礼申し上げます.

本研究を遂行するにあたり，有益なご助言と深いご理解を頂きました北海道大学大学院薬学研究院　薬剤分子設計学研究室助教，山田勇磨先生，同助教，中村孝司先生，北海道大学大学院薬学研究院　未来創剤学研究室特任准教授，梶本和昭先生，同研究室元特任助教，畠山浩人先生，同研究室特任助教，櫻井遊先生，同研究室特任助教，佐藤悠介先生に深く感謝致します.

IVRTCLSM 実験に対し，ご協力を頂くと共に，的確かつ有益なるご助言を頂きました東京大学大学院工学系研究科　マテリアル工学専攻教授　片岡一則先生，東京大学医学部　耳鼻咽喉科学教室助教　松本有先生，東京工業大学資源化学研究所　高分子材料部門助教　野本貴大先生に深く感謝致します.

本論文を審査して頂き，貴重な御指導及び御高閲を賜りました，北海道大学薬学研究院　臨床病態解析学研究室教授　武田宏司先生，同研究室講師　中川宏治先生に深く感謝致します.

実験にご協力頂きました，北海道大学大学院薬学研究院　薬剤分子設計学研究室　石塚太一博士，古川亮博士，Sarochin Santiwarangkool 修士に心より感謝致します.

北海道大学大学院薬学研究院　薬剤分子設計学研究室への出向中に，研究生活における様々な面でお世話になりました北海道大学大学院薬学研究院　薬剤分子設計学研究室並びに未来創剤学研究室の皆様に感謝致します.

本研究の遂行にあたり，種々のご協力を頂きました，大鵬薬品工業株式会社　製剤研究所の皆様に感謝致します.

最後に，長きに渡った本研究の遂行を理解し，陰ながら支援してくれた妻と子供たちに感謝致します.

2015 年 2 月

## 参考文献


1. Ichinose, Masakazu, *イラストでわかる呼吸器内科学*. 文光堂: 2014.
2. Voelkel, Norbert; Rounds, Sharon, *The Pulmonary Endothelium: Function in Health and Disease*. 2009.
3. 厚生労働省　人口動態調査. http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/81-1.html.
4. Center for Cancer Control and Information Services, National Cancer Center, Japan. http://ganjoho.jp/professional/index.html
5. Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. http://globocan.iarc.fr/Default.aspx
6. World Health Organization. http://www.who.int/en/.
7. Png, K. J.; Halberg, N.; Yoshida, M.; Tavazoie, S. F., A Microrna Regulon That Mediates Endothelial Recruitment and Metastasis by Cancer Cells. *Nature* **2012**, 481, 190-194.
8. McDonald, R. A.; Hata, A.; MacLean, M. R.; Morrell, N. W.; Baker, A. H., Microrna and Vascular Remodelling in Acute Vascular Injury and Pulmonary Vascular Remodelling. *Cardiovasc Res* **2012**, 93, 594-604.
9. Gaine, S. P.; Rubin, L. J., Primary Pulmonary Hypertension. *Lancet* **1998**, 352, 719-725.
10. Perry, C. M.; Balfour, J. A., Fomivirsen. *Drugs* **1999**, 57, 375-380; discussion 381.
11. Wong, E.; Goldberg, T., Mipomersen (Kynamro): A Novel Antisense Oligonucleotide Inhibitor for the Management of Homozygous Familial Hypercholesterolemia. *P T* **2014**, 39, 119-122.
12. Elbashir, S. M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T., Duplexes of 21-Nucleotide Rnas Mediate Rna Interference in Cultured Mammalian Cells. *Nature* **2001**, 411, 494-498.
13. Hutvagner, G.; Zamore, P. D., A Microrna in a Multiple-Turnover Rnai Enzyme Complex. *Science* **2002**, 297, 2056-2060.
14. Haussecker, D., The Business of Rnai Therapeutics in 2012. *Mol Ther Nucleic Acids* **2012**, 1, e8.
15. Davis, M. E., The First Targeted Delivery of Sirna in Humans Via a Self-Assembling, Cyclodextrin Polymer-Based Nanoparticle: From Concept to Clinic. *Mol Pharm* **2009**, 6, 659-668.
16. Tanaka, T.; Mangala, L. S.; Vivas-Mejia, P. E.; Nieves-Alicea, R.; Mann, A. P.; Mora, E.; Han, H. D.; Shahzad, M. M.; Liu, X.; Bhavane, R., *et al.*, Sustained Small Interfering Rna Delivery by Mesoporous Silicon Particles. *Cancer Res* **2010**, 70, 3687-3696.
17. Tabernero, J.; Shapiro, G. I.; LoRusso, P. M.; Cervantes, A.; Schwartz, G. K.; Weiss, G. J.; Paz-Ares, L.; Cho, D. C.; Infante, J. R.; Alsina, M., *et al.*, First-in-Humans Trial of an Rna Interference Therapeutic Targeting Vegf and Ksp in Cancer Patients with Liver Involvement. *Cancer Discov* **2013**, 3, 406-417.
18. Schultheis, B.; Strumberg, D.; Santel, A.; Vank, C.; Gebhardt, F.; Keil, O.; Lange, C.; Giese, K.; Kaufmann, J.; Khan, M., *et al.*, First-in-Human Phase I Study of the Liposomal Rna Interference Therapeutic Atu027 in Patients with Advanced Solid Tumors. *J Clin Oncol* **2014**, 32, 4141-4148.

19. Wooddell, C. I.; Rozema, D. B.; Hossbach, M.; John, M.; Hamilton, H. L.; Chu, Q.; Hegge, J. O.; Klein, J. J.; Wakefield, D. H.; Oropeza, C. E., *et al.*, Hepatocyte-Targeted Rnai Therapeutics for the Treatment of Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Mol Ther* **2013**, 21, 973-985.

20. Coelho, T.; Adams, D.; Silva, A.; Lozeron, P.; Hawkins, P. N.; Mant, T.; Perez, J.; Chiesa, J.; Warrington, S.; Tranter, E., *et al.*, Safety and Efficacy of Rnai Therapy for Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med* **2013**, 369, 819-829.

21. Ishiwatari, H.; Sato, Y.; Murase, K.; Yoneda, A.; Fujita, R.; Nishita, H.; Birukawa, N. K.; Hayashi, T.; Sato, T.; Miyanishi, K., *et al.*, Treatment of Pancreatic Fibrosis with Sirna against a Collagen-Specific Chaperone in Vitamin a-Coupled Liposomes. *Gut* **2013**, 62, 1328-1339.

22. Haussecker, D., Current Issues of Rnai Therapeutics Delivery and Development. *J Control Release* **2014**, 195, 49-54.

23. Matsumura, Y.; Maeda, H., A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res* **1986**, 46, 6387-6392.

24. Goda, N.; Suzuki, K.; Naito, M.; Takeoka, S.; Tsuchida, E.; Ishimura, Y.; Tamatani, T.; Suematsu, M., Distribution of Heme Oxygenase Isoforms in Rat Liver. Topographic Basis for Carbon Monoxide-Mediated Microvascular Relaxation. *J Clin Invest* **1998**, 101, 604-612.

25. Georgieva, J. V.; Hoekstra, D.; Zuhorn, I. S., Smuggling Drugs into the Brain: An Overview of Ligands Targeting Transcytosis for Drug Delivery across the Blood-Brain Barrier. *Pharmaceutics* **2014**, 6, 557-583.

26. Manjunath, N.; Dykxhoorn, D. M., Advances in Synthetic Sirna Delivery. *Discov Med* **2010**, 9, 418-430.

27. Gibbings, D. J.; Ciaudo, C.; Erhardt, M.; Voinnet, O., Multivesicular Bodies Associate with Components of Mirna Effector Complexes and Modulate Mirna Activity. *Nat Cell Biol* **2009**, 11, 1143-1149.

28. Siomi, H.; Siomi, M. C., Risc Hitches onto Endosome Trafficking. *Nat Cell Biol* **2009**, 11, 1049-1051.

29. Kogure, K.; Moriguchi, R.; Sasaki, K.; Ueno, M.; Futaki, S.; Harashima, H., Development of a Non-Viral Multifunctional Envelope-Type Nano Device by a Novel Lipid Film Hydration Method. *J Control Release* **2004**, 98, 317-323.

30. Nakamura, T.; Akita, H.; Yamada, Y.; Hatakeyama, H.; Harashima, H., A Multifunctional Envelope-Type Nanodevice for Use in Nanomedicine: Concept and Applications. *Acc Chem Res* **2012**, 45, 1113-1121.

31. Masuda, T.; Akita, H.; Nishio, T.; Niikura, K.; Kogure, K.; Ijiro, K.; Harashima, H., Development of Lipid Particles Targeted Via Sugar-Lipid Conjugates as Novel Nuclear Gene Delivery System. *Biomaterials* **2008**, 29, 709-723.

32. Hatakeyama, H.; Akita, H.; Kogure, K.; Oishi, M.; Nagasaki, Y.; Kihira, Y.; Ueno, M.; Kobayashi, H.; Kikuchi, H.; Harashima, H., Development of a Novel Systemic Gene Delivery System for Cancer Therapy with a Tumor-Specific Cleavable Peg-Lipid. *Gene Ther* **2007**, 14, 68-77.

33. Kakudo, T.; Chaki, S.; Futaki, S.; Nakase, I.; Akaji, K.; Kawakami, T.; Maruyama, K.; Kamiya, H.; Harashima, H., Transferrin-Modified Liposomes Equipped with a Ph-Sensitive

Fusogenic Peptide: An Artificial Viral-Like Delivery System. *Biochemistry* **2004**, 43, 5618-5628.

34. Chen, J.; Wharton, S. A.; Weissenhorn, W.; Calder, L. J.; Hughson, F. M.; Skehel, J. J.; Wiley, D. C., A Soluble Domain of the Membrane-Anchoring Chain of Influenza Virus Hemagglutinin (Ha2) Folds in Escherichia Coli into the Low-Ph-Induced Conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, 92, 12205-12209.

35. Jardetzky, T. S.; Lamb, R. A., Virology: A Class Act. *Nature* **2004**, 427, 307-308.

36. Subbarao, N. K.; Parente, R. A.; Szoka, F. C., Jr.; Nadasdi, L.; Pongracz, K., Ph-Dependent Bilayer Destabilization by an Amphipathic Peptide. *Biochemistry* **1987**, 26, 2964-2972.

37. Akita, H.; Masuda, T.; Nishio, T.; Niikura, K.; Ijiro, K.; Harashima, H., Improving in Vivo Hepatic Transfection Activity by Controlling Intracellular Trafficking: The Function of Gala and Maltotriose. *Mol Pharm* **2011**, 8, 1436-1442.

38. Ishitsuka, Taichi, 肺血管内皮細胞標的型核酸デリバリーシステムの構築. *北海道大学大学院生命科学院　学位論文* **2011**.

39. Hatakeyama, H.; Ito, E.; Akita, H.; Oishi, M.; Nagasaki, Y.; Futaki, S.; Harashima, H., A Ph-Sensitive Fusogenic Peptide Facilitates Endosomal Escape and Greatly Enhances the Gene Silencing of Sirna-Containing Nanoparticles in Vitro and in Vivo. *J Control Release* **2009**, 139, 127-132.

40. Mudhakir, D.; Akita, H.; Tan, E.; Harashima, H., A Novel Irq Ligand-Modified Nano-Carrier Targeted to a Unique Pathway of Caveolar Endocytic Pathway. *J Control Release* **2008**, 125, 164-173.

41. Ishitsuka, T.; Akita, H.; Harashima, H., Functional Improvement of an Irq-Peg-Mend for Delivering Genes to the Lung. *J Control Release* **2011**, 154, 77-83.

42. Mahato, R. I.; Anwer, K.; Tagliaferri, F.; Meaney, C.; Leonard, P.; Wadhwa, M. S.; Logan, M.; French, M.; Rolland, A., Biodistribution and Gene Expression of Lipid/Plasmid Complexes after Systemic Administration. *Hum Gene Ther* **1998**, 9, 2083-2099.

43. Li, S.; Tseng, W. C.; Stolz, D. B.; Wu, S. P.; Watkins, S. C.; Huang, L., Dynamic Changes in the Characteristics of Cationic Lipidic Vectors after Exposure to Mouse Serum: Implications for Intravenous Lipofection. *Gene Ther* **1999**, 6, 585-594.

44. Hatanaka, K.; Asai, T.; Koide, H.; Kenjo, E.; Tsuzuku, T.; Harada, N.; Tsukada, H.; Oku, N., Development of Double-Stranded Sirna Labeling Method Using Positron Emitter and Its in Vivo Trafficking Analyzed by Positron Emission Tomography. *Bioconjug Chem* **2010**, 21, 756-763.

45. Matsumoto, Y.; Nomoto, T.; Cabral, H.; Matsumoto, Y.; Watanabe, S.; Christie, R. J.; Miyata, K.; Oba, M.; Ogura, T.; Yamasaki, Y.*, et al.*, Direct and Instantaneous Observation of Intravenously Injected Substances Using Intravital Confocal Micro-Videography. *Biomed Opt Express* **2010**, 1, 1209-1216.

46. Nomoto, T.; Matsumoto, Y.; Miyata, K.; Oba, M.; Fukushima, S.; Nishiyama, N.; Yamasoba, T.; Kataoka, K., In Situ Quantitative Monitoring of Polyplexes and Polyplex Micelles in the Blood Circulation Using Intravital Real-Time Confocal Laser Scanning Microscopy. *J Control Release* **2011**, 151, 104-109.

47. Daniels, R. S.; Douglas, A. R.; Skehel, J. J.; Wiley, D. C.; Naeve, C. W.; Webster, R. G.;

Rogers, G. N.; Paulson, J. C., Antigenic Analyses of Influenza Virus Haemagglutinins with Different Receptor-Binding Specificities. *Virology* **1984**, 138, 174-177.

48. Yamada, S.; Suzuki, Y.; Suzuki, T.; Le, M. Q.; Nidom, C. A.; Sakai-Tagawa, Y.; Muramoto, Y.; Ito, M.; Kiso, M.; Horimoto, T.*, et al.*, Haemagglutinin Mutations Responsible for the Binding of H5n1 Influenza a Viruses to Human-Type Receptors. *Nature* **2006**, 444, 378-382.

49. Stevens, J.; Blixt, O.; Tumpey, T. M.; Taubenberger, J. K.; Paulson, J. C.; Wilson, I. A., Structure and Receptor Specificity of the Hemagglutinin from an H5n1 Influenza Virus. *Science* **2006**, 312, 404-410.

50. Knibbs, R. N.; Goldstein, I. J.; Ratcliffe, R. M.; Shibuya, N., Characterization of the Carbohydrate Binding Specificity of the Leukoagglutinating Lectin from Maackia Amurensis. Comparison with Other Sialic Acid-Specific Lectins. *J Biol Chem* **1991**, 266, 83-88.

51. Wang, W. C.; Cummings, R. D., The Immobilized Leukoagglutinin from the Seeds of Maackia Amurensis Binds with High Affinity to Complex-Type Asn-Linked Oligosaccharides Containing Terminal Sialic Acid-Linked Alpha-2,3 to Penultimate Galactose Residues. *J Biol Chem* **1988**, 263, 4576-4585.

52. Takesada, H.; Shibuya, N.; Nagashima, N., The Interaction of Elderberry (Sambucus Sieboldiana) Bark Lectin and Sialyloligosaccharides as Detected by 1h-Nmr. *J Biochem* **1992**, 112, 143-146.

53. El-Sayed, A.; Masuda, T.; Khalil, I.; Akita, H.; Harashima, H., Enhanced Gene Expression by a Novel Stearylated Inf7 Peptide Derivative through Fusion Independent Endosomal Escape. *J Control Release* **2009**, 138, 160-167.

54. Plank, C.; Oberhauser, B.; Mechtler, K.; Koch, C.; Wagner, E., The Influence of Endosome-Disruptive Peptides on Gene Transfer Using Synthetic Virus-Like Gene Transfer Systems. *J Biol Chem* **1994**, 269, 12918-12924.

55. Wright, M. J.; Rosenthal, E.; Stewart, L.; Wightman, L. M.; Miller, A. D.; Latchman, D. S.; Marber, M. S., Beta-Galactosidase Staining Following Intracoronary Infusion of Cationic Liposomes in the in Vivo Rabbit Heart Is Produced by Microinfarction Rather Than Effective Gene Transfer: A Cautionary Tale. *Gene Ther* **1998**, 5, 301-308.

56. Kitazume, S.; Imamaki, R.; Ogawa, K.; Komi, Y.; Futakawa, S.; Kojima, S.; Hashimoto, Y.; Marth, J. D.; Paulson, J. C.; Taniguchi, N., Alpha2,6-Sialic Acid on Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (Pecam) Regulates Its Homophilic Interactions and Downstream Antiapoptotic Signaling. *J Biol Chem* **2010**, 285, 6515-6521.

57. Vaishnaw, A. K.; Gollob, J.; Gamba-Vitalo, C.; Hutabarat, R.; Sah, D.; Meyers, R.; de Fougerolles, T.; Maraganore, J., A Status Report on Rnai Therapeutics. *Silence* **2010**, 1, 14.

58. Ecker, D. M.; Jones, S. D.; Levine, H. L., The Therapeutic Monoclonal Antibody Market. *MAbs* **2014**, 0.

59. Dalby, R.; Suman, J., Inhalation Therapy: Technological Milestones in Asthma Treatment. *Adv Drug Deliv Rev* **2003**, 55, 779-791.

60. Patton, J. S.; Byron, P. R., Inhaling Medicines: Delivering Drugs to the Body through the Lungs. *Nat Rev Drug Discov* **2007**, 6, 67-74.

61. Ware, L. B.; Matthay, M. A., The Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med*

**2000**, 342, 1334-1349.

62. Abadie, Y.; Bregeon, F.; Papazian, L.; Lange, F.; Chailley-Heu, B.; Thomas, P.; Duvaldestin, P.; Adnot, S.; Maitre, B.; Delclaux, C., Decreased Vegf Concentration in Lung Tissue and Vascular Injury During Ards. *Eur Respir J* **2005**, 25, 139-146.

63. Saito-Katsuragi, M.; Asada, H.; Niizeki, H.; Katoh, F.; Masuzawa, M.; Tsutsumi, M.; Kuniyasu, H.; Ito, A.; Nojima, H.; Miyagawa, S., Role for Connexin 26 in Metastasis of Human Malignant Melanoma: Communication between Melanoma and Endothelial Cells Via Connexin 26. *Cancer* **2007**, 110, 1162-1172.

64. DeLisser, H.; Liu, Y.; Desprez, P. Y.; Thor, A.; Briasouli, P.; Handumrongkul, C.; Wilfong, J.; Yount, G.; Nosrati, M.; Fong, S.*, et al.*, Vascular Endothelial Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (Pecam-1) Regulates Advanced Metastatic Progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, 107, 18616-18621.

65. de Fougerolles, A.; Novobrantseva, T., Sirna and the Lung: Research Tool or Therapeutic Drug? *Curr Opin Pharmacol* **2008**, 8, 280-285.

66. Santel, A.; Aleku, M.; Roder, N.; Mopert, K.; Durieux, B.; Janke, O.; Keil, O.; Endruschat, J.; Dames, S.; Lange, C.*, et al.*, Atu027 Prevents Pulmonary Metastasis in Experimental and Spontaneous Mouse Metastasis Models. *Clin Cancer Res* **2010**, 16, 5469-5480.

67. Kurosaki, T.; Kishikawa, R.; Matsumoto, M.; Kodama, Y.; Hamamoto, T.; To, H.; Niidome, T.; Takayama, K.; Kitahara, T.; Sasaki, H., Pulmonary Gene Delivery of Hybrid Vector, Lipopolyplex Containing N-Lauroylsarcosine, Via the Systemic Route. *J Control Release* **2009**, 136, 213-219.

68. Ge, Q.; Filip, L.; Bai, A.; Nguyen, T.; Eisen, H. N.; Chen, J., Inhibition of Influenza Virus Production in Virus-Infected Mice by Rna Interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, 101, 8676-8681.

69. Miyawaki-Shimizu, K.; Predescu, D.; Shimizu, J.; Broman, M.; Predescu, S.; Malik, A. B., Sirna-Induced Caveolin-1 Knockdown in Mice Increases Lung Vascular Permeability Via the Junctional Pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2006**, 290, L405-413.

70. Mishra, S.; Webster, P.; Davis, M. E., Pegylation Significantly Affects Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Non-Viral Gene Delivery Particles. *Eur J Cell Biol* **2004**, 83, 97-111.

71. Li, W.; Szoka, F. C., Jr., Lipid-Based Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery. *Pharm Res* **2007**, 24, 438-449.

72. Guo, X.; Szoka, F. C., Jr., Steric Stabilization of Fusogenic Liposomes by a Low-Ph Sensitive Peg--Diortho Ester--Lipid Conjugate. *Bioconjug Chem* **2001**, 12, 291-300.

73. Remaut, K.; Lucas, B.; Braeckmans, K.; Demeester, J.; De Smedt, S. C., Pegylation of Liposomes Favours the Endosomal Degradation of the Delivered Phosphodiester Oligonucleotides. *J Control Release* **2007**, 117, 256-266.

74. Hatakeyama, H.; Akita, H.; Harashima, H., A Multifunctional Envelope Type Nano Device (Mend) for Gene Delivery to Tumours Based on the Epr Effect: A Strategy for Overcoming the Peg Dilemma. *Adv Drug Deliv Rev* **2011**, 63, 152-160.

75. Allen, T. M.; Martin, F. J., Advantages of Liposomal Delivery Systems for Anthracyclines.

*Semin Oncol* **2004**, 31, 5-15.

76. Zhao, X. B.; Muthusamy, N.; Byrd, J. C.; Lee, R. J., Cholesterol as a Bilayer Anchor for Pegylation and Targeting Ligand in Folate-Receptor-Targeted Liposomes. *J Pharm Sci* **2007**, 96, 2424-2435.

77. Richard, I.; Thibault, M.; De Crescenzo, G.; Buschmann, M. D.; Lavertu, M., Ionization Behavior of Chitosan and Chitosan-DNA Polyplexes Indicate That Chitosan Has a Similar Capability to Induce a Proton-Sponge Effect as Pei. *Biomacromolecules* **2013**, 14, 1732-1740.

78. Song, Y. K.; Liu, F.; Chu, S.; Liu, D., Characterization of Cationic Liposome-Mediated Gene Transfer in Vivo by Intravenous Administration. *Hum Gene Ther* **1997**, 8, 1585-1594.

79. Ren, T.; Song, Y. K.; Zhang, G.; Liu, D., Structural Basis of Dotma for Its High Intravenous Transfection Activity in Mouse. *Gene Ther* **2000**, 7, 764-768.

80. Regelin, A. E.; Fankhaenel, S.; Gurtesch, L.; Prinz, C.; von Kiedrowski, G.; Massing, U., Biophysical and Lipofection Studies of Dotap Analogs. *Biochim Biophys Acta* **2000**, 1464, 151-164.

81. Senior, J.; Gregoriadis, G., Stability of Small Unilamellar Liposomes in Serum and Clearance from the Circulation: The Effect of the Phospholipid and Cholesterol Components. *Life Sci* **1982**, 30, 2123-2136.

82. Semple, S. C.; Chonn, A.; Cullis, P. R., Influence of Cholesterol on the Association of Plasma Proteins with Liposomes. *Biochemistry* **1996**, 35, 2521-2525.

83. Schroeder, A.; Levins, C. G.; Cortez, C.; Langer, R.; Anderson, D. G., Lipid-Based Nanotherapeutics for Sirna Delivery. *J Intern Med* **2010**, 267, 9-21.

84. Cullis, P. R.; Verkleij, A. J., Modulation of Membrane Structure by Ca2+ and Dibucaine as Detected by 31p Nmr. *Biochim Biophys Acta* **1979**, 552, 546-551.

85. Strumberg, D.; Schultheis, B.; Traugott, U.; Vank, C.; Santel, A.; Keil, O.; Giese, K.; Kaufmann, J.; Drevs, J., Phase I Clinical Development of Atu027, a Sirna Formulation Targeting Pkn3 in Patients with Advanced Solid Tumors. *Int J Clin Pharmacol Ther* **2012**, 50, 76-78.

86. Santel, A.; Aleku, M.; Keil, O.; Endruschat, J.; Esche, V.; Fisch, G.; Dames, S.; Loffler, K.; Fechtner, M.; Arnold, W.*, et al.*, A Novel Sirna-Lipoplex Technology for Rna Interference in the Mouse Vascular Endothelium. *Gene Ther* **2006**, 13, 1222-1234.

87. Civelli, E. M.; Meroni, R.; Cozzi, G.; Milella, M.; Suman, L.; Vercelli, R.; Severini, A., The Role of Interventional Radiology in Biliary Complications after Orthotopic Liver Transplantation: A Single-Center Experience. *Eur Radiol* **2004**, 14, 579-582.

88. Ambegia, E.; Ansell, S.; Cullis, P.; Heyes, J.; Palmer, L.; MacLachlan, I., Stabilized Plasmid-Lipid Particles Containing Peg-Diacylglycerols Exhibit Extended Circulation Lifetimes and Tumor Selective Gene Expression. *Biochim Biophys Acta* **2005**, 1669, 155-163.

89. Nomoto, T.; Matsumoto, Y.; Toh, K.; Christie, R. J.; Miyata, K.; Oba, M.; Cabral, H.; Murakami, M.; Fukushima, S.; Nishiyama, N.*, et al.*, [Evaluation of the Dynamics of Drug Delivery Systems (Dds) Using Intravital Real-Time Confocal Laser Scanning Microscopy]. *Yakugaku Zasshi* **2012**, 132, 1347-1354.

90. Zhou, Z.; Christofidou-Solomidou, M.; Garlanda, C.; DeLisser, H. M., Antibody against Murine Pecam-1 Inhibits Tumor Angiogenesis in Mice. *Angiogenesis* **1999**, 3, 181-188.

91. Barth, A.; Wanek, L. A.; Morton, D. L., Prognostic Factors in 1,521 Melanoma Patients

with Distant Metastases. *J Am Coll Surg* **1995**, 181, 193-201.

92. Oh, P.; Li, Y.; Yu, J.; Durr, E.; Krasinska, K. M.; Carver, L. A.; Testa, J. E.; Schnitzer, J. E., Subtractive Proteomic Mapping of the Endothelial Surface in Lung and Solid Tumours for Tissue-Specific Therapy. *Nature* **2004**, 429, 629-635.

93. Li, S.; Tan, Y.; Viroonchatapan, E.; Pitt, B. R.; Huang, L., Targeted Gene Delivery to Pulmonary Endothelium by Anti-Pecam Antibody. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2000**, 278, L504-511.

94. Trubetskoy, V. S.; Torchilin, V. P.; Kennel, S. J.; Huang, L., Use of N-Terminal Modified Poly(L-Lysine)-Antibody Conjugate as a Carrier for Targeted Gene Delivery in Mouse Lung Endothelial Cells. *Bioconjug Chem* **1992**, 3, 323-327.

95. Bangham, A. D.; Horne, R. W., Negative Staining of Phospholipids and Their Structural Modification by Surface-Active Agents as Observed in the Electron Microscope. *J Mol Biol* **1964**, 8, 660-668.

96. Kusumoto, K.; Akita, H.; El-Sayed, A.; Harashima, H., Effect of the Anchor in Polyethylene Glycol-Lipids on the Transfection Activity of Pegylated Cationic Liposomes Encapsulating DNA. *Biol Pharm Bull* **2012**, 35, 445-448.

97. Akita, H.; Ishii, S.; Miura, N.; Shaheen, S. M.; Hayashi, Y.; Nakamura, T.; Kaji, N.; Baba, Y.; Harashima, H., A DNA Microarray-Based Analysis of Immune-Stimulatory and Transcriptional Responses of Dendritic Cells to Kala-Modified Nanoparticles. *Biomaterials* **2013**, 34, 8979-8990.

98. Meure, L. A.; Foster, N. R.; Dehghani, F., Conventional and Dense Gas Techniques for the Production of Liposomes: A Review. *AAPS PharmSciTech* **2008**, 9, 798-809.

99. Jeffs, L. B.; Palmer, L. R.; Ambegia, E. G.; Giesbrecht, C.; Ewanick, S.; MacLachlan, I., A Scalable, Extrusion-Free Method for Efficient Liposomal Encapsulation of Plasmid DNA. *Pharm Res* **2005**, 22, 362-372.

100. Wagner, A.; Platzgummer, M.; Kreismayr, G.; Quendler, H.; Stiegler, G.; Ferko, B.; Vecera, G.; Vorauer-Uhl, K.; Katinger, H., Gmp Production of Liposomes--a New Industrial Approach. *J Liposome Res* **2006**, 16, 311-319.

101. Walsh, C.; Ou, K.; Belliveau, N. M.; Leaver, T. J.; Wild, A. W.; Huft, J.; Lin, P. J.; Chen, S.; Leung, A. K.; Lee, J. B., *et al.*, Microfluidic-Based Manufacture of Sirna-Lipid Nanoparticles for Therapeutic Applications. *Methods Mol Biol* **2014**, 1141, 109-120.

102. Khalil, I. A.; Kogure, K.; Akita, H.; Harashima, H., Uptake Pathways and Subsequent Intracellular Trafficking in Nonviral Gene Delivery. *Pharmacol Rev* **2006**, 58, 32-45.

103. Stroock, A. D.; Dertinger, S. K.; Ajdari, A.; Mezic, I.; Stone, H. A.; Whitesides, G. M., Chaotic Mixer for Microchannels. *Science* **2002**, 295, 647-651.

104. Zhigaltsev, I. V.; Belliveau, N.; Hafez, I.; Leung, A. K.; Huft, J.; Hansen, C.; Cullis, P. R., Bottom-up Design and Synthesis of Limit Size Lipid Nanoparticle Systems with Aqueous and Triglyceride Cores Using Millisecond Microfluidic Mixing. *Langmuir* **2012**, 28, 3633-3640.

105. Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M.; Danielsen, M., Lipofection: A Highly Efficient, Lipid-Mediated DNA-Transfection Procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**, 84, 7413-7417.

106. Leventis, R.; Silvius, J. R., Interactions of Mammalian Cells with Lipid Dispersions

Containing Novel Metabolizable Cationic Amphiphiles. *Biochim Biophys Acta* **1990**, 1023, 124-132.

107. Mislick, K. A.; Baldeschwieler, J. D., Evidence for the Role of Proteoglycans in Cation-Mediated Gene Transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, 93, 12349-12354.

108. Masuda, T.; Akita, H.; Harashima, H., Evaluation of Nuclear Transfer and Transcription of Plasmid DNA Condensed with Protamine by Microinjection: The Use of a Nuclear Transfer Score. *FEBS Lett* **2005**, 579, 2143-2148.

109. Holland, J. W.; Cullis, P. R.; Madden, T. D., Poly(Ethylene Glycol)-Lipid Conjugates Promote Bilayer Formation in Mixtures of Non-Bilayer-Forming Lipids. *Biochemistry* **1996**, 35, 2610-2617.

110. Meyer, O.; Kirpotin, D.; Hong, K.; Sternberg, B.; Park, J. W.; Woodle, M. C.; Papahadjopoulos, D., Cationic Liposomes Coated with Polyethylene Glycol as Carriers for Oligonucleotides. *J Biol Chem* **1998**, 273, 15621-15627.

111. Woodle, M. C., Controlling Liposome Blood Clearance by Surface-Grafted Polymers. *Adv Drug Deliv Rev* **1998**, 32, 139-152.

112. Song, L. Y.; Ahkong, Q. F.; Rong, Q.; Wang, Z.; Ansell, S.; Hope, M. J.; Mui, B., Characterization of the Inhibitory Effect of Peg-Lipid Conjugates on the Intracellular Delivery of Plasmid and Antisense DNA Mediated by Cationic Lipid Liposomes. *Biochim Biophys Acta* **2002**, 1558, 1-13.

113. Sou, K.; Endo, T.; Takeoka, S.; Tsuchida, E., Poly(Ethylene Glycol)-Modification of the Phospholipid Vesicles by Using the Spontaneous Incorporation of Poly(Ethylene Glycol)-Lipid into the Vesicles. *Bioconjug Chem* **2000**, 11, 372-379.

114. Carrion, C.; Domingo, J. C.; de Madariaga, M. A., Preparation of Long-Circulating Immunoliposomes Using Peg-Cholesterol Conjugates: Effect of the Spacer Arm between Peg and Cholesterol on Liposomal Characteristics. *Chem Phys Lipids* **2001**, 113, 97-110.

115. Kusumoto, K.; Akita, H.; Ishitsuka, T.; Matsumoto, Y.; Nomoto, T.; Furukawa, R.; El-Sayed, A.; Hatakeyama, H.; Kajimoto, K.; Yamada, Y.*, et al.*, Lipid Envelope-Type Nanoparticle Incorporating a Multifunctional Peptide for Systemic Sirna Delivery to the Pulmonary Endothelium. *ACS Nano* **2013**, 7, 7534-7541.

116. Kenji Kusumoto, Hideyoshi Harashima, Hidetaka Akita, Hiroto Hatakeyama, Taichi Ishitsuka 肺送達のためのベクター，導入剤及び使用. PCT/JP2012/056406, 2011.

117. Kusumoto, K.; Akita, H.; Santiwarangkool, S.; Harashima, H., Advantages of Ethanol Dilution Method for Preparing Gala-Modified Liposomal Sirna Carriers on the in Vivo Gene Knockdown Efficiency in Pulmonary Endothelium. *Int J Pharm* **2014**, 473, 144-147.